

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Caracterización del rol de adenosina en la respuesta
inmune cardíaca a la infección por *Trypanosoma cruzi*
y efecto de su manipulación en la progresión de la
miocardiopatía chagásica**

Bioquímica Natalia Eberhardt

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET

Departamento de Bioquímica Clínica-Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba, Argentina.

2019

DIRECTORA DE TESIS

Prof. Dra. María del Pilar Aoki

COMISIÓN ASESORA DE TESIS

Dra. Virginia E. Rivero

Dra. Andrea Rópolo

Dr. Germán A. Roth

EVALUADORA EXTERNA

Dra. Nora B. Goren

El presente trabajo de tesis fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT-UNC), el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FONCyT).

Tabla de contenidos

Tabla de contenidos	1
Abreviaturas	5
Resumen	10
Abstract	11
Capítulo 1: Introducción	12
Enfermedad de Chagas	13
Problema sanitario a escala global	13
Epidemiología	13
Transmisión vectorial	15
Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
Otras formas de transmisión de la enfermedad de Chagas	17
Presentación Clínica	17
Cardiomiopatía chagásica crónica	20
Respuesta inmune frente a <i>T. cruzi</i>	24
Rol del sistema inmune innato en la respuesta a <i>T. cruzi</i>	25
Rol del sistema inmune adaptativo en la respuesta a <i>T. cruzi</i>	29
Desafíos en el tratamiento terapéutico de la enfermedad de Chagas	31
Sistema purinérgico	33
Sistema de señalización purinérgica	33
La hipoxia como factor desencadenante de la inducción del sistema purinérgico	35
Modulación de la respuesta inmune por el sistema purinérgico	36
Antecedentes previos del grupo	38
Hipótesis	39
Objetivo general	40

Objetivos específicos	40
Capítulo 2: Resultados I Parte A: <i>Impacto de la actividad enzimática de CD73 en la modulación de la respuesta inmune y concomitante carga parasitaria en diferentes tejidos blanco de la infección</i>	41
Efecto de la deficiencia en la actividad enzimática de CD73 en la respuesta inmune cardíaca y la carga parasitaria local	42
Impacto de la deficiencia de CD73 en la parasitemia y monocitos circulantes	53
Efecto de la ausencia de ADO dependiente de la actividad enzimática de CD73 en la carga parasitaria de tejido adiposo y la respuesta inmune local	55
Influencia de la inhibición de la actividad enzimática de CD73 en la respuesta inmune hepática y la carga parasitaria local	59
Capítulo 3: Resultados I Parte B: <i>Niveles extracelulares de ATP y ADO en diferentes tejidos blanco de la infección y efecto de la actividad de CD73 en el balance del microambiente purinérgico local</i>	63
Determinación de los niveles extracelulares de ATP/ADO en los tejidos post-infección	64
Análisis de las fuentes celulares de la enzima CD73 en los tejidos blanco de infección	66
Conclusiones parciales de Resultados I	70
Capítulo 4: Resultados II: <i>Rol del sistema purinérgico en la miocarditis de pacientes con enfermedad de Chagas crónica terminal</i>	71
Determinación de los niveles plasmáticos de eATP en los pacientes crónicos seropositivos	72
Análisis clínico de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica con cardiomiopatía	73
Estudio del infiltrado celular de los explantes de tejido cardíaco de pacientes con cardiopatía de Chagas crónica	74
Determinación del grado de miocarditis de los explantes de tejido cardíaco de pacientes chagásicos trasplantados	77

Determinación la expresión de CD73 en los explantes de pacientes según el grado de miocarditis	78
Determinación de la expresión de HIF-1 α en los explantes de tejido cardíaco según el grado de miocarditis	80
Determinación de la relación entre el grado de miocarditis y la expresión de HIF-1 α y de CD73	81
Determinación de la relación entre la carga parasitaria y la expresión de HIF-1 α y de CD73	82
Conclusiones parciales de Resultados II	84
Capítulo 5: Discusión y Conclusión	85
Discusión	86
Conclusión	97
Capítulo 6: Materiales y Métodos	98
PARTE 1: Modelo de infección experimental	99
Declaración de Bioética	99
Animales de laboratorio	99
Genotipificación de animales genéticamente modificados	99
Parásitos e infección experimental	101
Análisis histológico de tejido adiposo visceral	101
Determinación de parasitemia	102
Análisis histológico y marcadores de daño cardíaco	102
Aislamiento de células inmunes en tejido cardíaco	102
Aislamiento de células inmunes en tejido adiposo visceral	103
Aislamiento de células inmunes en tejido hepático	103
Análisis de citometría de flujo	103
Determinación de citoquinas por ELISA	104

Medición de óxido nítrico	105
Cuantificación de carga parasitaria por PCR	106
Cuantificación de ATP	106
Medición de niveles de ADO por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	107
Análisis de expresión de CD73 en tejidos por inmunofluorescencia	109
Análisis estadístico	110
PARTE 2: Experimentos con muestras de pacientes	111
Declaración de Bioética	111
Selección de población estudiada	111
Análisis de explantes de tejido cardíacos	113
Clasificación de miocarditis	114
Inmunofluorescencia	114
Cuantificación de carga parasitaria	115
Análisis Estadístico	115
Anexos	116
Anexo I: Genotipificación de ratones modificados genéticamente CD73KO	117
Anexo II: Tabla de reactivos y anticuerpos utilizados para citometría de flujo	118
Anexo III: Producción científica durante el desarrollo de la Tesis Doctoral	119
Publicaciones	119
Becas	120
Cursos de posgrado	120
Presentaciones en congresos y conferencias	121
Menciones de honor y premios	123
Pasantía	124
Bibliografía	125

Abreviaturas

ADA: adenosín deaminasa

ADO: adenosina

ADORA: receptor de adenosina

ADP: adenosín difosfato

ALT: alanina aminotransferasa

AMP: Adenosín monofosfato

APC: alofocianina

APCCy7: alofocianina cianina-7

APCP: adenosina 5' α , β -metileno-difosfato

AST: aspartato aminotransferasa

ATP: trifosfato de adenosina

Arg-1: Arginasa-1

ARN: Ácido ribonucleico

CD: cluster de diferenciación

CD39: ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1

CD73: ecto-5'-nucleotidasa

CHM: complejo mayor de histocompatibilidad

CK: creatina quinasa total

CK-MB: Creatin-kinasa isoforma MB

CMSP: Células mononucleares de sangre periférica

CPA: célula presentadora de antígenos

CV: coeficiente de variación

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño

DDVI: diámetro diastólico del ventrículo izquierdo

DTU: unidades discretas de tipificación

Dpi: días post-infección

eATP: ATP extracelular

ECG: electrocardiograma

ELISA: ensayo por inmunoadsorción asociado a enzimas

FACS: *Fluorescence-activated cell sorting*

FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FSC: *forward light scatter* - dispersión de luz hacia adelante

GPI: glicosilfosfatidilinositol

H&E: tinción de hematoxilina/eosina

HIF: factor inducible por hipoxia

HPF: *high power field* - campo de gran aumento

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

HSL: lipasa sensible a hormonas

IFI: inmunofluorescencia

IHQ: inmunohistoquímica

IL: interleuquina

IMC: índice de masa corporal

INCUCAI: Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante

IFN- γ : interferón gamma

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

KO: *knock-out*

LDL: lipoproteína de baja densidad

LLOQ: límite inferior de cuantificación

LOD: límite de detección

LPL: lipoproteinlipasa

Ly6C: complejo antígeno linfocítico 6 locus C

Ly6G: complejo antígeno linfocítico 6 locus G

Ma: macrófagos

MFI: intensidad de fluorescencia media

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido

NI: no infectado

NIH: *National Institute of Health*

NK: *natural killer*

NO: óxido nítrico

NT: nitración de residuos tirosina

NYHA: *New York Heart Association*

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: solución tampón fosfato salino

PCR: Reacción en Cadena de Polimerasa

PE: ficoeritrina

PECy7: Ficoeritrina-Cianina 7

PerCP: proteína clorofila peridina

PerCPCy5.5: proteína clorofila peridina-cianina 5.5

RRP: Receptores de reconocimiento de patrones

ROIs: regiones de interés

ROS: especies reactivas del oxígeno

SFB: suero fetal bovino

SSC: *side light scatter* – dispersión lateral de luz

SVF: fracción estromal vascular

TAC: constricción aórtica transversal

TAV: tejido adiposo visceral

TCR: Receptor de célula T

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

TLR: Receptores tipo Toll

TNF: Factor de necrosis tumoral

T reg: Células T regulatorias

UA: unidades arbitrarias

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

WT: "*wild type*" ratones control

Resumen

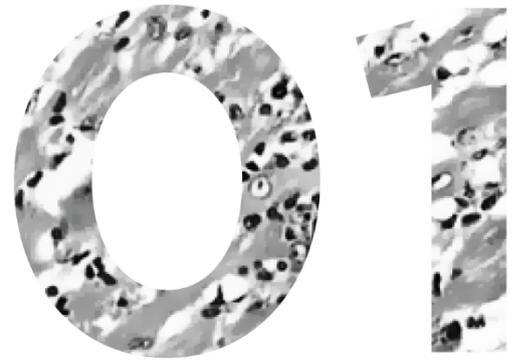
La cardiomiopatía crónica, causada por el parásito intracelular *Trypanosoma cruzi*, constituye un importante problema de salud pública en América Latina debido a su prevalencia y mortalidad. Alrededor del 30% de los pacientes crónicos desarrollan una miocarditis de evolución lenta y progresiva que conduce a dilatación ventricular e insuficiencia cardíaca. A pesar de que la patofisiología de la enfermedad de Chagas ha sido estudiada durante décadas, todavía se desconocen los mecanismos involucrados en la progresión clínica cardíaca. Un potencial sistema inmunosupresor que podría regular las funciones antiparasitarias de las células inmunes es la vía de CD73/adenosina (ADO). La hipótesis que guía esta tesis sostiene que los mecanismos regulatorios gatillados por el sistema purinérgico serían críticos para la progresión hacia la cardiomiopatía. En este Trabajo de Tesis se investigó el efecto de la anulación genética de CD73 en un modelo experimental murino sobre la respuesta inmune microbicida en diferentes tejidos blanco de infección. Nuestros resultados revelan que la deficiencia de ADO por inhibición de la actividad enzimática de CD73 mejora la respuesta inmune antiparasitaria temprana en el miocardio. Sin embargo, también se resalta el hecho de que la respuesta anti-*T. cruzi* se modula de manera dependiente del tejido. A su vez, mediante el estudio de biopsias cardíacas de pacientes con la patología terminal se demuestra la estrecha relación entre tres factores críticos en el desarrollo de la miocarditis crónica: la carga parasitaria tisular, el influjo de células del sistema inmune y la vía purinérgica regulatoria que se gatilla localmente para controlar la respuesta inmunitaria y el consecuente daño cardíaco. Este estudio realiza sustanciales aportes al conocimiento de la relación entre la biología del tejido cardíaco y la inmunidad anti-parasitaria y posibilita sentar las bases y evidencias para contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para pacientes con enfermedad de Chagas.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas - *Trypanosoma cruzi* - Sistema purinérgico - CD73 - adenosina - cardiomiopatía crónica.

Abstract

Chronic cardiomyopathy, caused by the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*, constitutes a major public health problem in Latin America due to its prevalence and mortality. About 30% of chronic patients develop a slow and progressive myocarditis that leads to ventricular dilation and heart failure. Although the pathophysiology of Chagas disease has been studied for decades, the mechanisms involved in cardiomyopathy progression are still unknown. A potential immunosuppressive system that could regulate the antiparasitic functions of immune cells is the CD73 ectoenzyme/adenosine (ADO) pathway. The hypothesis that guides this Thesis holds that the regulatory mechanisms triggered by the activation of the purinergic system would be critical for the progression towards cardiomyopathy. Throughout this Doctoral Thesis, we investigated the effect of the genetic abrogation of CD73 in a murine experimental model on the microbicidal immune response in different *T. cruzi*- target tissues. Our findings reveal that ADO deficiency due to the inhibition of the enzymatic activity of CD73 improves the early antiparasitic immune response in the myocardium. However, the results also describe the fact that the anti-*T. cruzi* response is modulated in a tissue dependent manner. In turn, the findings in cardiac biopsies from patients demonstrate the close relationship between three critical factors in the development of chronic myocarditis: the tissue parasitic load, the influx of inflammatory cells and the purinergic pathway locally triggered to control the immune response and consequent heart damage. This study makes substantial contributions to the knowledge of the relationship between heart biology and anti-parasitic immunity and makes possible to lay the foundations of evidences to contribute to the development of new therapeutic strategies for Chagas disease patients.

Keywords: Chagas disease - *Trypanosoma cruzi* - Purinergic system - CD73 - adenosine - chronic cardiomyopathy.



CAPÍTULO

INTRODUCCIÓN

Caracterización del rol de adenosina en la respuesta inmune cardíaca a la infección por *Trypanosoma cruzi* y efecto de su manipulación en la progresión de la miocardiopatía chagásica.

Enfermedad de Chagas

Problema sanitario a escala global

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, es una enfermedad parasitaria que resulta de la infección por el protozoo *Trypanosoma cruzi* y constituye un importante problema de salud pública en América Latina debido a su prevalencia, morbilidad y mortalidad. Esta enfermedad se considera dentro del grupo de las enfermedades desatendidas o enfermedades de la pobreza. Esta zoonosis afecta sobre todo a la población de zonas endémicas en 21 países de América Latina, donde se transmite a los seres humanos principalmente por las heces u orina de insectos triatomíneos conocidos como vinchucas, chinches o con diferentes nombres, según la zona geográfica. Sin embargo, la enfermedad se ha extendido a regiones no endémicas debido a los intensos movimientos migratorios [1] y a sus formas de transmisión no vectorial por lo que miles de nuevos casos se diagnostican cada año, constituyendo un grave problema sanitario a escala global [2].

En este escenario, la investigación para cubrir la brecha de conocimiento principalmente en la fisiopatología, diagnóstico y tratamiento de los pacientes con Chagas, se ha visto obstaculizada por varios factores: el escaso desarrollo de nuevos fármacos tripanocidas, la falta de conocimiento de su mecanismo de acción y los efectos adversos causados por los dos únicos fármacos utilizados contra *T. cruzi* (beznidazol y nifurtimox), la falta de biomarcadores tempranos de eficacia terapéutica y, sobre todo, la importancia dada a la teoría autoinmune de la enfermedad que ha prevalecido durante muchos años [3]. Teniendo en cuenta que la enfermedad de Chagas es una problemática de salud compleja caracterizada por un conjunto de factores interrelacionados: biomédico, epidemiológico, socio-cultural, ambiental y político, este trabajo de Tesis Doctoral abordará el estudio de la patogénesis de la enfermedad de Chagas focalizándose en el rol del sistema purinérgico en el desarrollo de la respuesta inmune dentro de este amplio contexto.

Epidemiología

La enfermedad de Chagas ha sido una enfermedad tropical desatendida y un importante problema de salud pública en numerosos países latinoamericanos desde hace ya muchas décadas. La OMS ha considerado que la tripanosomiasis es la cuarta enfermedad transmisible que tiene mayor impacto en la salud pública en América Latina después de la

malaria, la tuberculosis y la esquistosomiasis. Los últimos reportes de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) estiman que la prevalencia en América Latina es entre 8-10 millones de personas infectadas con *T. cruzi* [4], más de 25 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad y alrededor de 100 millones (aproximadamente el 20% de la población en América Latina) viven en zonas donde se detectan insectos vectores [5, 6].

En Argentina, según las cifras oficiales del Programa Nacional de Chagas, se estima que en el país existen -al menos- 1.600.000 personas infectadas, esta cifra representa casi el 4% de la población total del país. Se calcula que alrededor de 300.000 personas sufren afecciones cardíacas asociadas con la enfermedad de Chagas, sabiendo que 3 o 4 de cada 10 personas infectadas desarrollan la cardiomiopatía crónica en algún momento de su vida [4, 7].

En las últimas décadas, se han producido importantes cambios epidemiológicos y la enfermedad se ha extendido a países no endémicos [8-11], principalmente de Europa y otros países como Estados Unidos, Canadá, Australia y Japón debido a la emigración de miles de pacientes asintomáticos desde países endémicos (Figura 1) [12-14].

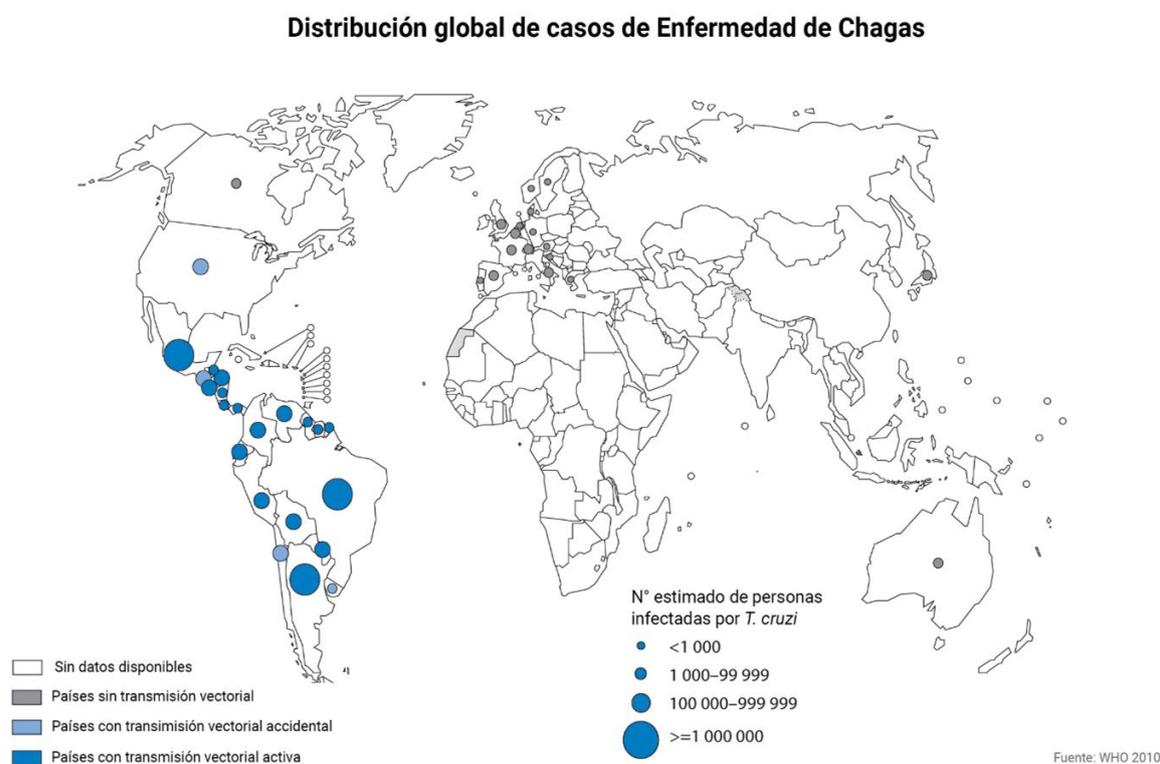


Figura 1. Distribución global de casos de enfermedad de Chagas, según estimaciones oficiales y situación de transmisión vectorial 2006-2010. Fuente: Organización Mundial de la Salud (WHO). <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>

Transmisión vectorial

Se deben considerar diversos escenarios para entender la dinámica de la infección por *T. cruzi*. La principal forma de transmisión de la infección en las zonas endémicas es la vectorial. La infección por *T. cruzi* es una entidad compleja causada por un grupo heterogéneo de cepas del parásito que implica una gran diversidad de animales salvajes en el ciclo natural, como así también los animales domésticos juegan un importante papel epidemiológico en algunas áreas [15]. La distribución de la enfermedad de Chagas en áreas endémicas involucra diferentes nichos ecológicos y más de cien especies del vector de la enfermedad [16]. Cinco especies de vectores triatominos (*T. infestans*, *R. prolixus*, *T. dimidiata*, *P. megistus* y *T. brasiliensis*) tienen un importante rol epidemiológico [17]. En América Latina, el insecto triatomino prospera en viviendas de condiciones socio-económicas de pobreza y comúnmente infecta a las poblaciones rurales [18]. El control vectorial ha resultado el método más útil para prevenir la enfermedad de Chagas, gracias a la implementación de programas tanto nacionales como regionales (OPS) y mundiales (OMS) de interrupción de la transmisión vectorial.

En Argentina, 11 de las 19 provincias son consideradas de moderado a alto de riesgo de transmisión vectorial activa según el Programa Nacional de Chagas. Pese a que hay alrededor de 7 especies más de vinchucas que presentan diferente grado de relevancia en el ciclo de transmisión del parásito, la principal especie vector en el país es *Triatoma infestans*, que está adaptada a las zonas periurbanas en mayor contacto con las personas y los reservorios domésticos del parásito (perros, gatos, etc.).

Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

Los triatominos se infectan en el ciclo selvático o doméstico al ingerir sangre de mamíferos infectados que tienen tripomastigotes circulantes. Cuando el insecto vector pica al mamífero y se alimenta de su sangre infectada, los parásitos que ingiere sufren una transformación madurativa en el intestino, pasando de tripomastigote a epimastigote. Luego de replicarse por fisión binaria se diferencian a tripomastigotes metacíclicos infecciosos. Los seres humanos se infectan a través de la picadura del triatomino hematófago, el cual defeca cerca de la herida de la mordedura. Las heces de los vectores infectados presentan tripomastigotes que pueden penetrar en el nuevo huésped a través de las membranas

mucosas o la piel. Una vez dentro del organismo, el parásito entra en el flujo sanguíneo e invade las células cercanas al sitio de inoculación adquiriendo la forma intracelular llamada amastigote que provocará daño a los tejidos blanco de infección. Al multiplicarse intracelularmente, los amastigotes se transforman en tripomastigotes que se liberan a la circulación sanguínea, para continuar infectando células de diferentes tejidos [19-21]. En la Figura 2 se representa un esquema del ciclo de infección del *T. cruzi*.

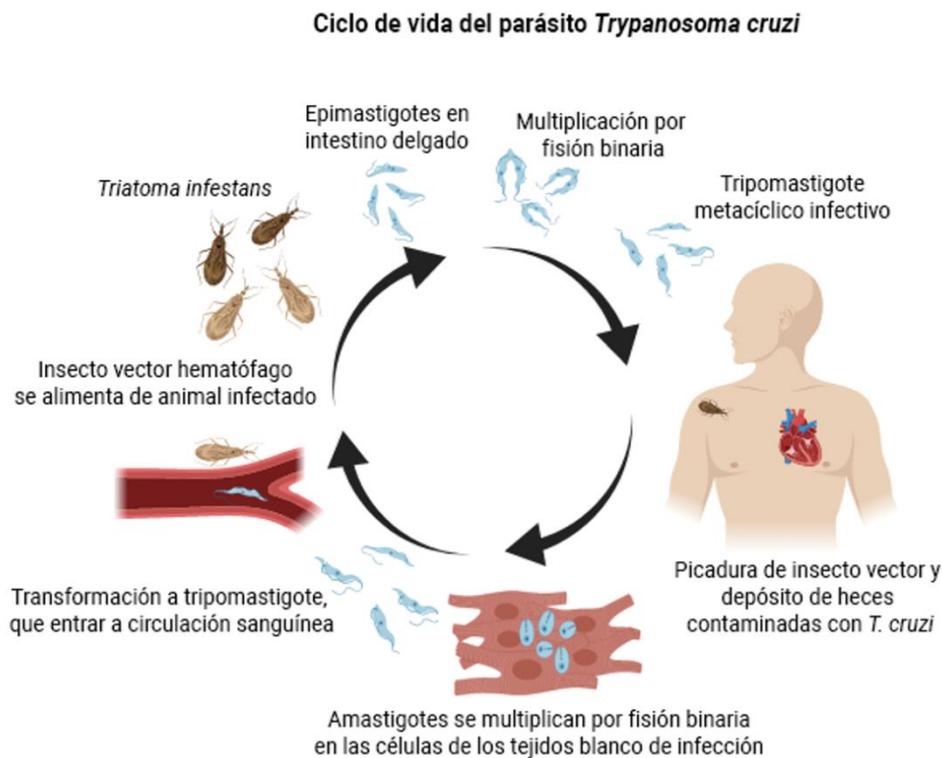


Figura 2. Ciclo de vida del parásito *T. cruzi* y transmisión vectorial. El mamífero infectado por *T. cruzi* presenta parásitos circulantes en sangre en forma de tripomastigotes. Cuando el insecto vector lo pica y se alimenta de su sangre infectada, los parásitos que ingiere sufren una transformación madurativa en el intestino de epimastigotes a tripomastigotes infectivos. Al picar a un nuevo mamífero, el insecto vector defeca cerca de la picadura y los tripomastigotes pueden penetrar en el nuevo huésped. Una vez en el organismo, el parásito invade las células por las que tiene tropismo adquiriendo la forma intracelular (amastigote). Al multiplicarse los amastigotes, generan tripomastigotes que se liberan a la circulación sanguínea, para continuar infectando células de diferentes tejidos.

Trypanosoma cruzi presenta una diversidad de cepas que se diferencian en sus características biológicas, bioquímicas y moleculares [22, 23]. En el año 2012, un comité de expertos llegó a un nuevo consenso respecto a la nomenclatura y las subdivisiones de *T. cruzi* clasificándolo en siete “Unidades Discretas de Tipificación” (o DTU, del inglés, “Discrete

Typing Units") de Tc I a Tc VI y Tc bat, las cuales tienen diferente prevalencia según las regiones geográficas y los nichos de transmisión en el ciclo doméstico o salvaje [24]. Una DTU es un repertorio de stocks de parásitos que están más estrechamente relacionados entre sí cuando son caracterizados con diferentes marcadores genéticos, moleculares e inmunológicos [25]. Tanto la diversidad genética del parásito como la interacción del mismo con el huésped son claves para la comprensión de la patogénesis de la enfermedad [26].

Otras formas de transmisión de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas también se puede transmitir a través de mecanismos no vectoriales, como la transmisión sanguínea: transfusiones de sangre, donaciones de órganos no controladas, al compartir jeringas entre usuarios de drogas intravenosas o excepcionalmente por accidentes de laboratorio o prácticas quirúrgicas con material contaminado. También puede transmitirse de forma congénita, verticalmente de madre a hijo; y por transmisión oral, mediante la ingesta de alimentos contaminados con heces de vectores infectados [27, 28]. Estos mecanismos son las principales formas de infección en zonas urbanas y países no endémicos y, por tanto, los principales objetivos para la reducción de la propagación en dichos países.

Presentación Clínica

La enfermedad de Chagas se presenta en 2 fases: aguda y crónica. Luego de la primoinfección, el individuo cursa inicialmente con una etapa aguda que presenta un período de parasitemia, pudiéndose encontrar en la transmisión vectorial, en ocasiones, el sitio de la entrada de los parásitos por el signo de Romaña (complejo oftalmoganglionar) o chagoma de inoculación. Esta fase de la enfermedad se caracteriza por la replicación de amastigotes en leucocitos y células de los tejidos subcutáneos, y también, por el desarrollo de edema intersticial, cuadro febril, infiltración leucocitaria y adenomegalia [8, 18, 29]. Luego de la diseminación a través del sistema linfático y del torrente sanguíneo, los parásitos se replican en diferentes tejidos del organismo y se concentran principalmente en las células musculares y células ganglionares. Los signos y síntomas son dependientes de la invasión tisular y la replicación del agente etiológico, por lo cual se diagnostica con métodos de visualización directa del parásito. La mayoría de los pacientes no presenta síntomas o presenta cuadros clínicos inespecíficos, y sólo el 5-10% de los individuos desarrollan formas

graves de la enfermedad aguda [30]. La principal complicación de esta etapa es la miocarditis aguda donde el daño cardíaco deriva de la invasión directa de los cardiomiocitos por los parásitos con la consiguiente inflamación o la meningoencefalitis [20]. En la mayoría de las personas infectadas, el sistema inmunológico logra controlar la infección y reducir la parasitemia. Luego de 1 a 3 meses, los síntomas clínicos desaparecen espontáneamente y se establece un equilibrio en el cual el parásito no es totalmente eliminado pero su presencia no alcanza para producir una enfermedad aparente [31]. Esta etapa es llamada fase crónica indeterminada o latente, en la cual los pacientes permanecen asintomáticos por largos períodos de tiempo e incluso de por vida. El diagnóstico de la enfermedad en la etapa crónica se realiza mediante pruebas serológicas que efectúan la búsqueda de anticuerpos anti-*T. cruzi* utilizando técnicas como ELISA, inmunofluorescencia y hemaglutinación indirecta (HAI). El diagnóstico se confirma cuando al menos 2 de estas pruebas son reactivas. Los pacientes con enfermedad crónica, en su mayoría (60-70 %), no presentan síntomas clínicos de la enfermedad si bien, recientemente, se ha constatado en estudios con metodologías complementarias más sensibles, que muchos de ellos presentan anomalías cardíacas sin expresión clínica [32, 33]. Una proporción significativa de los individuos, estimada entre 30 y 40% presenta alteraciones clínicas a nivel cardíaco o digestivo que se manifiestan entre 10 y 20 años después de la primoinfección. La enfermedad de Chagas crónica está relacionada con varios trastornos gastrointestinales que resultan del daño a las inervaciones motoras entéricas conduciendo a la dilatación principalmente del esófago y colon. En el examen microscópico, se observan lesiones inflamatorias focales con infiltración linfocítica, y un número notablemente reducido de neuronas en el plexo mesentérico [34, 35].

De los diferentes órganos blanco de la infección, el corazón es el órgano más frecuentemente afectado y presenta la mayor importancia médica, dado que la cardiomiopatía crónica es considerada la infección parasitaria cardíaca más grave [36], por ser la principal responsable de incapacidad y muerte de los pacientes infectados [33, 37]. Alrededor del 30-40% de los pacientes con enfermedad crónica presenta anomalías en los estudios electrocardiográficos y ecocardiográficos característicos de una miocarditis de evolución lenta y progresiva que conduce a dilatación ventricular e insuficiencia cardíaca crónica [38]. Dependiendo del grado de daño cardíaco la tasa de mortalidad a 10 años varía de <10% a >80% [39]. Esta patología tiene presentaciones clínicas polimórficas y las

complicaciones más graves de la enfermedad pueden llevar a la necesidad de trasplante cardíaco. El desarrollo de la cardiomiopatía de Chagas crónica se ilustra en la Figura 3.

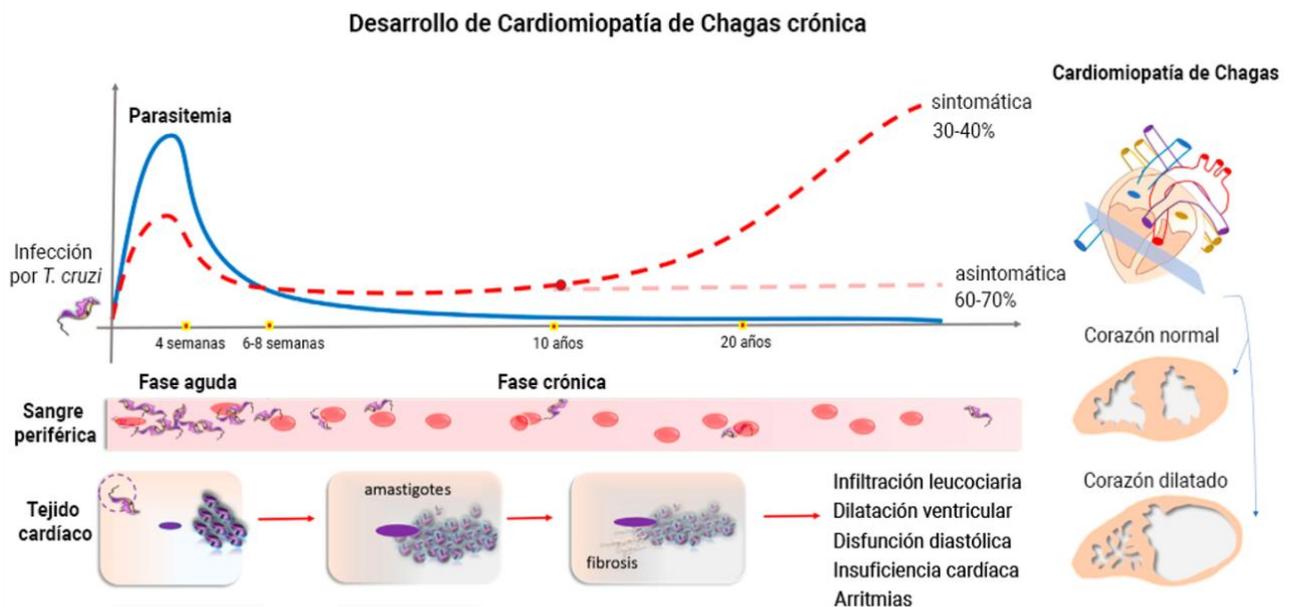


Figura 3. Desarrollo de la enfermedad de Chagas. Historia natural de la Enfermedad de Chagas crónica y el desarrollo de la cardiomiopatía. La fase aguda de la infección por *T. cruzi* se caracteriza por una parasitemia alta, que comienza a disminuir después de 4 semanas. Durante el comienzo de la fase crónica (6 a 8 semanas), la parasitemia permanece baja y algunos pacientes (30 a 40%) luego de 10 a 20 años pueden presentar anomalías en los estudios electrocardiográficos y ecocardiográficos característicos de una miocarditis de evolución lenta y progresiva. Los parásitos invaden y se replican en los cardiomiocitos lo que lleva a infiltración leucocitaria, inflamación crónica con posterior fibrosis y, en consecuencia, adelgazamiento del miocardio e hipertrofia cardíaca lo que conduce a dilatación ventricular, disfunción diastólica, arritmias e insuficiencia cardíaca. *Adaptada de De Bona et al (2018) Front. Immunol. 9:1842*

Sin embargo, el tropismo de *T. cruzi* no está restringido al tejido cardíaco. De hecho, el parásito se ha detectado en una amplia gama de otros reservorios, como el hígado y el tejido adiposo visceral (TAV) [40]. La evidencia acumulada sugiere que el TAV es un nicho esencial para la persistencia del parásito porque puede servir como un reservorio enriquecido de nutrientes, donde el parásito puede persistir en estado inactivo evitando la respuesta inmune [41, 42]. Sin embargo, los mediadores involucrados en la falta de respuesta del sistema inmunológico local son en gran parte desconocidos.

Por otra parte, la reactivación de la enfermedad de Chagas puede ocurrir en pacientes inmunocomprometidos con infecciones crónicas, por ejemplo, por la co-infección con Virus

de inmunodeficiencia humana (VIH) o por el tratamiento con fármacos inmunosupresores en el caso de ser receptores de trasplantes de órganos sólidos o médula ósea [43, 44].

Cardiomiopatía chagásica crónica

La cardiomiopatía chagásica crónica es la principal causa de miocarditis a nivel mundial [45]. Las manifestaciones más tempranas de la enfermedad son la aparición de anormalidades en los sistemas de conducción y alteraciones en la motilidad del segmento parietal del ventrículo izquierdo. Las manifestaciones clínicas tardías incluyen el bloqueo completo de los sistemas de conducción eléctrica, taquicardia ventricular sostenida y no sostenida, disfunción del nodo sinusal desencadenando bradicardia severa, aneurisma apical trombogénico en el ventrículo izquierdo e insuficiencia cardíaca [33, 36, 46]. Las complicaciones cardíacas resultan en la remodelación de la matriz colágena extracelular y posterior fibrosis, que conduce a un aumento de la rigidez del miocardio, disfunción sistólica y diastólica, y en última instancia, miocardiopatía dilatada severa asociada a palpitaciones, síncope, arritmias y la potencial muerte súbita, que es la principal causa de mortalidad en estos pacientes [47-49]. Los cambios histológicos y morfológicos que se observan en el miocardio de los pacientes con cardiomiopatía de Chagas incluyen el adelgazamiento de las paredes ventriculares, agrandamiento biventricular, aneurismas apicales, y trombos murales. A su vez, las lesiones cardíacas presentan destrucción generalizada de las células miocárdicas, fibrosis difusa moderada o intensa, edema e infiltración leucocitaria con predominio de células mononucleares y posiblemente presencia de nidos de amastigotes [50] (Figura 4).

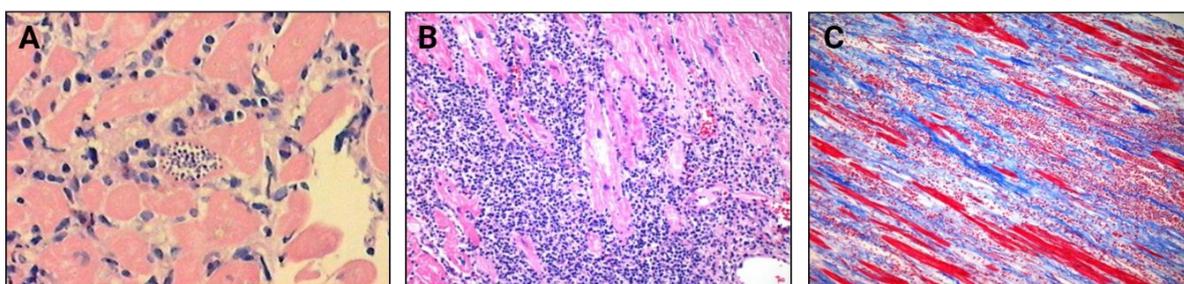


Figura 4. Características de las lesiones cardíacas crónicas en pacientes con cardiomiopatía de Chagas. (A) Presencia de un nido de amastigotes de *T. cruzi*, con reacción inflamatoria adyacente. **(B)** Área de miocarditis severa, difusa con daño miocítico multifocal. **(C)** Miocarditis severa, difusa con zona de extensa fibrosis densa tipo de reemplazo. Adaptada de Viotti R; Vigliano C. *Chagas disease. A practical approach based on medical research*. Buenos Aires. Medica Panamericana Editorial. 2014.

La patogenia de la enfermedad cardíaca es probablemente la consecuencia de múltiples factores entre los cuales los principales son: el daño a los cardiomiocitos dependiente de la persistencia del parásito debido a la incapacidad del sistema inmunológico de controlar eficientemente la infección y las lesiones cardíacas dependientes de la respuesta inmune prolongada, daño al sistema nervioso autónomo y alteraciones en la microvasculatura [51].

Diversos trabajos científicos estudian la patogénesis de la enfermedad de Chagas focalizándose en el rol del sistema inmune en el desarrollo de la misma. Una de las incógnitas que todavía no se han podido resolver es la razón por la cual ante la infección por *T. cruzi*, el sistema inmunológico falla en erradicar totalmente al parásito. La respuesta inmune es capaz de controlar la parasitemia en la etapa aguda de la infección, pero en general es insuficiente para eliminar totalmente la infección, y la mayoría de las personas permanecen infectadas de por vida. En principio, la incapacidad del hospedador para lograr la erradicación del parásito sugiere que la actividad efectora del sistema inmune dirigida contra el mismo es insuficiente debido a la inadecuada activación de la respuesta inmune específica o la excesiva regulación de la misma. Es de vital importancia considerar, que al mismo tiempo que el sistema inmune intenta controlar la infección, el agente infeccioso desencadena diversos mecanismos de resistencia que le permiten evadir el ataque inmunitario [52].

La controversia de los factores inmunes involucrados en la patogenia de la cardiomiopatía en la fase crónica ha tenido lugar debido a que varias publicaciones han argumentado la escasa presencia del parásito en zonas del tejido afectadas dándole lugar a la hipótesis de la autoinmunidad [53]. Se han propuesto varios mecanismos que promueven la inflamación de los tejidos, pero la importancia relativa de cada uno aún no se ha dilucidado por completo. La idea de que algún factor diferente al parásito contribuya significativamente a la progresión de la miocarditis fue apoyada por varios estudios que demostraron dos mecanismos claves de autoinmunidad: la activación del sistema inmune del hospedador y el mimetismo molecular, los cuales han sido ampliamente estudiados durante más de medio siglo [54-57]. El primero implica la exposición de proteínas intracelulares tras el daño del tejido inducido por el parásito que resulta en la liberación de antígenos propios en un entorno inflamatorio el cual desencadena las respuestas mediadas por linfocitos T [58]. En

el segundo caso, el mimetismo molecular se refiere a las similitudes entre los péptidos propios del huésped y los antígenos del patógeno que dan lugar a la activación cruzada de células T y B autoreactivas [55, 59, 60].

Más recientemente, ha resurgido la noción que fue reportada por diversos autores a principio de los 90' que refiere a que la presencia del parásito es esencial para el desarrollo y la progresión de la miocardiopatía de la enfermedad de Chagas [61, 62]. Tarleton y colaboradores demostraron que existe una correlación entre la persistencia del parásito en el tejido cardíaco y la severidad de la cardiomiopatía [63]. Por su parte, Higuchi y colaboradores publicaron la existencia de correlación entre la presencia de *T. cruzi* y el infiltrado inflamatorio moderado a severo en autopsias de pacientes con enfermedad de Chagas [64]. Asimismo, también ha sido publicado que la presencia de los parásitos en el tejido cardíaco de pacientes con la enfermedad crónica, aunque los mismos se encontraban en baja cantidad, presentaba una relación directa con la severidad de la miocarditis [65]. La observación microscópica de la presencia de nidos de amastigotes en las biopsias de corazón de pacientes crónicos es difícil debido su escasa cantidad en comparación con la extensión del daño miocítico e infiltrado inflamatorio. Sin embargo, en los últimos años se han utilizado diferentes técnicas de inmunohistoquímica y PCR con mayor sensibilidad y se ha reportado una fuerte correlación entre la presencia de focos inflamatorios y la concentración de antígenos y/o ADN del parásito [66-68]. Estos trabajos sugieren que, a pesar de la escasa presencia de parásitos en las biopsias de tejido, el daño potencial que pueden provocar con el transcurso del tiempo es comparable a las cantidades de parásitos presente durante la etapa aguda. Esto se sustenta por dos evidencias previamente reportadas, el hecho de que los tratamientos tripanocidas son capaces de reducir la carga parasitaria y disminuir la progresión de la enfermedad [69], y que los tratamientos inmunosupresores aumentan la parasitemia y causan la exacerbación de la enfermedad [70, 71]. Asimismo, esto se evidencia también en modelos animales con deficiencias genéticas en los cuales una mayor eficacia en la respuesta inmune antiparasitaria lleva a la disminución del parasitismo tisular y reduce la severidad de la enfermedad crónica [56]. Como ya fue mencionado, numerosos trabajos evidencian que la miocarditis y el daño tisular están asociados a la presencia del parásito. Sin embargo, hasta el momento no se han logrado identificar cuáles son los mecanismos moleculares gatillados en la respuesta

inmune del huésped que llevan a la progresión de la enfermedad con la consecuente dilatación del corazón y las alteraciones fisiopatológicas asociadas. Es necesario entonces comprender qué perfil de respuesta inmunológica resultaría en el mejor equilibrio entre la eliminación del parásito y el daño tisular para así, desarrollar estrategias que estimulen correctamente el sistema inmunológico contra el parásito y de esta manera, lograr prevenir la cardiomiopatía chagásica crónica.

En cuanto a la terapéutica, el tratamiento de elección para los pacientes con cardiomiopatía de Chagas crónica en etapa avanzada es el trasplante cardíaco. En América del Sur, la enfermedad de Chagas es la tercera causa de indicación de trasplante de corazón, después de la miocardiopatía dilatada idiopática y la miocardiopatía isquémica [72]. Según el Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante (INCUCAI), la organización nacional que centraliza los servicios de trasplante, el 6% de los pacientes en la lista de espera de trasplante cardíaco sufren de miocardiopatía de Chagas crónica [73, 74]. El Hospital Universitario Fundación Favaloro es el principal hospital de la República Argentina en realizar trasplantes de órganos. Entre febrero de 1993 y marzo de 2019, se realizaron 579 trasplantes de corazón en este centro. Durante este período, 37 personas con enfermedad de Chagas fueron sometidas a trasplante cardíaco ortotópico, lo que representa aproximadamente el 6% del total de trasplantes cardíacos realizados.

El diagnóstico de reactivación de Chagas postrasplante se realiza mediante la detección del parásito en sangre mediante la observación microscópica con el método de Strout, siendo ésta una prueba rápida y sensible cuando el paciente presenta niveles incrementados de parasitemia [75]. A su vez, existen metodologías aún más sensibles para la detección de la reactivación mediante pruebas de PCR en muestras de sangre y de tejidos como biopsias de piel en casos de paniculitis o biopsias endomiocárdicas en casos de protocolo postrasplante [76, 77]. La serología carece de valor predictivo o diagnóstico para confirmar la reactivación. La incidencia de reactivación de la enfermedad de Chagas luego del trasplante de corazón en los pacientes con cardiomiopatía crónica severa varía entre el 21 y el 45%, y debido a este riesgo, el protocolo de monitoreo se debe llevar a cabo estrictamente para identificar la reactivación antes de la ocurrencia de los signos y síntomas de la misma y daño al órgano trasplantado. A su vez, en los países donde no se realiza la serología preventiva

correspondiente en los bancos de sangre y órganos existe la posibilidad de transmisión de *T. cruzi* donde los receptores de trasplantes de hígado y el riñón de donantes infectados presentan un menor riesgo (13-22 %) que los receptores de trasplante cardíaco donde la infección ocurre en un 75-100 % de los casos [78]. Durante la reactivación se recomienda minimizar la dosis de mantenimiento del tratamiento inmunosupresor teniendo en cuenta que la mayoría de los pacientes responde favorablemente al tratamiento antiparasitario. Por último, aunque la etiología chagásica es un predictor independiente de mayor mortalidad para los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica avanzada con respecto a otras causas [79], la morbilidad y mortalidad postrasplante de los receptores con enfermedad de Chagas es similar a los pacientes no infectados, por lo que esta alternativa terapéutica es segura y eficaz.

Respuesta inmune frente a *T. cruzi*

El control de *T. cruzi* depende de la respuesta inmune que se monta durante la fase temprana de la infección, la cual es crítica para la supervivencia del hospedador, para el desarrollo de una respuesta protectora y para evitar el progreso a una etapa crónica con diferentes desenlaces clínicos. Durante la fase aguda de la infección, los parásitos se replican en sangre y en diferentes tejidos, mostrando un fuerte tropismo por el miocardio. La persistencia del parásito dentro de los tejidos desencadena la activación y el reclutamiento de células del sistema inmune innato y adaptativo que ejercen diferentes mecanismos celulares y moleculares para combatir la infección [80]. Entre las células que participan activamente, tanto en la fase aguda como en la crónica, se encuentran los monocitos, macrófagos, granulocitos, células NK (*natural killer*), células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T CD8+ ó citotóxicos y linfocitos T CD4+ ó cooperadores. A su vez, una gran diversidad de factores solubles como quemoquinas, citoquinas y anticuerpos son necesarios para orquestar el desarrollo de una respuesta inmune efectiva contra la infección (Figura 5) [41].

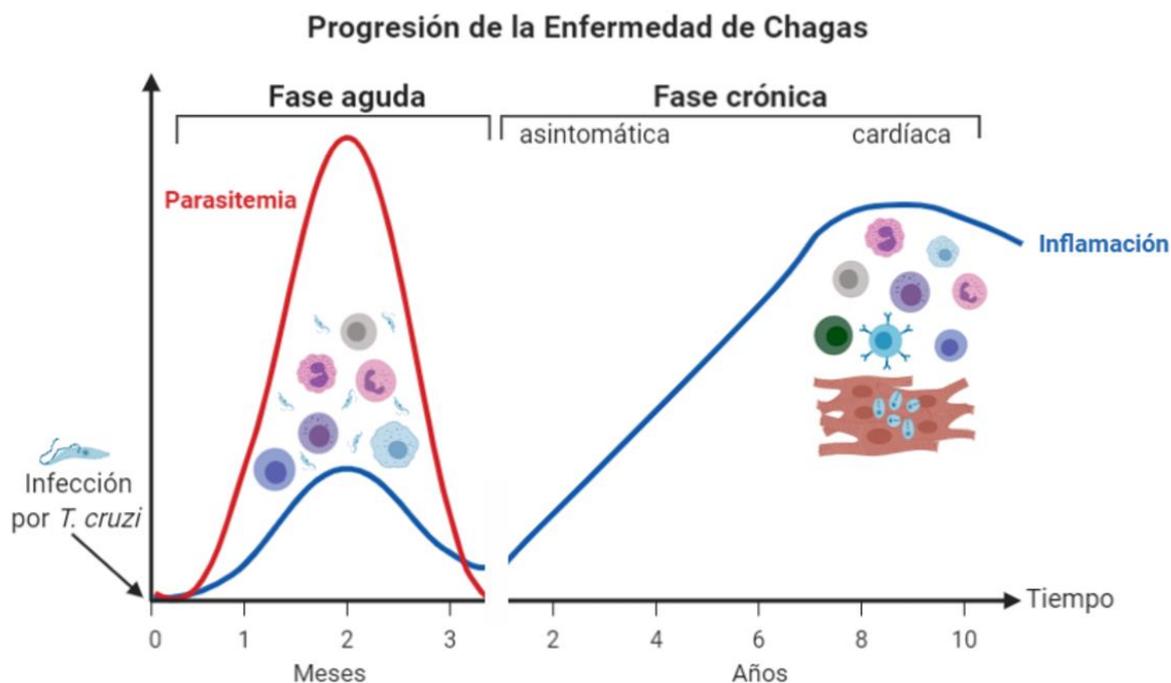


Figura 5. Progresión de la enfermedad de Chagas. Luego de la infección por *T. cruzi*, la mayoría de los individuos desarrollan parasitemia asociada con una respuesta inmune celular y humoral robusta que involucra células del sistema inmune innato y adaptativo. Tras el control de la infección inicial, la parasitemia y los síntomas disminuyen, a medida que el individuo ingresa a la fase crónica. La mayoría de los individuos no entran en la forma clínica indeterminada (asintomática), y aproximadamente el 30-40% de los individuos progresa a la forma clínica cardíaca de enfermedad asociada con un estado inflamatorio mayor. Tipos de células inmunes representadas en la figura: monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células NK (natural killer), células dendríticas, células B y linfocitos T CD4 y CD8. Adaptado de Machado et al (2012) *Seminars in Immunopathology*, 34, 753-770.

Rol del sistema inmune innato en la respuesta a *T. cruzi*

El sistema inmune innato es el encargado de controlar la replicación y la diseminación del parásito a los distintos tejidos blanco de la infección. A su vez, también es el responsable de activar y regular el perfil de activación de la respuesta inmune adaptativa. En los tejidos del organismo, se pueden hallar células de sistema inmune como macrófagos y células dendríticas, las que poseen en su membrana plasmática receptores de reconocimiento de patrones (RRP) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como por ejemplo las proteínas ancladas a la membrana mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI) presentes en *T. cruzi*. Al activarse los receptores en presencia de los correspondientes ligandos, se activan las vías de transducción de señales intracitoplasmáticas que activan al

factor de transcripción NF- κ B. Este factor de transcripción se une a los promotores e induce la expresión y secreción de diversas citoquinas proinflamatorias como TNF, IL-1 β , IL-8 e IL-12 [80]. El TNF secretado por los macrófagos difunde e induce la expresión de selectinas P y E e integrinas en las células endoteliales de las vénulas cercanas al sitio de inflamación. Estas moléculas funcionan como anclas que permiten a los neutrófilos y a otras células efectoras, interactuar de manera estable con el endotelio y extravasarse hacia el tejido formando así el infiltrado inflamatorio. El parásito induce la expresión y secreción de TNF e IL-8 por parte de los macrófagos, lo que permite el anclaje, diapédesis y llegada de los neutrófilos hacia el tejido infectado [81].

Las células fagocíticas, entre ellas los macrófagos y monocitos, representan la primera línea de defensa contra el parásito y determinan, al menos en parte, el desarrollo de la inmunidad adaptativa [82]. Dentro de las poblaciones de leucocitos encargados de la erradicación del parásito en el corazón, los macrófagos representan una de las principales poblaciones que infiltran el tejido tempranamente [83], y permanecen como una importante población inmune en explantes de tejido cardíaco de pacientes con miocardiopatía de Chagas crónica severa junto con las células T [84]. Estas células presentan una notable plasticidad y pueden cambiar su fenotipo y función en respuesta a las señales ambientales dando lugar a diferentes subpoblaciones de monocitos/macrófagos [85]. En estado basal, los monocitos se generan en la médula ósea a partir de precursores hematopoyéticos, y entran en la circulación a través del receptor CCR2. En ratones, los monocitos circulantes son una población fenotípica y funcionalmente heterogénea y se puede caracterizar de acuerdo a la expresión del marcador Ly6C [86]. Alrededor del 50-60% de los monocitos circulantes pertenece a la subpoblación de monocitos inflamatorios o clásicos (con fenotipo Ly6C^{alto} CCR2^{alto} CX3CR1^{bajo} CD62L+), los cuales presentan una vida relativamente corta en circulación para luego, migrar a los tejidos inflamados donde son reclutados a través de la expresión de un gradiente de quemoquinas. El otro subconjunto de monocitos pertenece a la subpoblación de monocitos de patrullaje o no clásicos que se caracteriza por expresar Ly6C^{bajo} CCR2^{bajo} CX3CR1^{alto} CD62L- y se encuentra en números relativamente bajos en circulación en estado basal [87]. En condiciones inflamatorias, el número de monocitos clásicos aumenta debido al incremento de la monocitopoyesis en médula ósea y bazo [88]. En humanos, los monocitos circulantes pueden clasificarse en tres subpoblaciones

principales según la expresión de CD14 (correceptor de lipopolisacáridos) y CD16 (receptor capaz de reconocer la porción Fc de IgG tipo III) [89]. El 85-90% de los monocitos humanos en sangre periférica en condiciones de homeostasis corresponde a los monocitos clásicos que presentan alta expresión de CD14 y no presentan expresión de CD16. La subpoblación intermedia expresa niveles relativamente altos de CD14 junto con baja expresión de CD16, mientras que la subpoblación no clásica expresa bajos niveles de CD14 con alta expresión de CD16. Varios estudios han demostrado que la expansión de los monocitos intermedios y no clásicos circulantes se presenta en pacientes con procesos inflamatorios [90, 91] y enfermedades infecciosas [92]. Sin embargo, todavía se desconoce cuál es la causa del incremento de esta población, y si tienen un rol protector o patogénico en las diferentes enfermedades.

En cuanto a los macrófagos, si se considera la clasificación de las subpoblaciones en una escala lineal, encontramos en sus extremos a los macrófagos tipo M1 y tipo M2. Los macrófagos inflamatorios o clásicamente activados (tipo M1) se generan en respuesta a señales de IFN- γ provenientes de células NK o de linfocitos T CD8 $^{+}$ y de TNF durante la activación de la respuesta inmune. Esta población tiene mayor actividad microbicida/tumoricida, de producción de citoquinas y metabolitos pro-inflamatorios. Los macrófagos tipo M1 son esenciales para el control de la infección, ya que producen óxido nítrico (NO), un metabolito antimicrobiano que detiene el crecimiento de los parásitos. Asimismo, los macrófagos tipo M1 secretan citoquinas proinflamatorias como IL-12 y TNF, las cuales inducen la respuesta Th1 con la producción de IFN- γ por parte de las células T CD8 $^{+}$ [93]. Por el contrario, la polarización de los macrófagos hacia un perfil tipo M2 se puede inducir a través de diferentes señales de activación que conducen a macrófagos con diferentes fenotipos M2. Los macrófagos regulatorios son importantes en la fase de resolución de la inflamación ya que poseen actividad anti-inflamatoria mediante la producción de la citoquina inmunosupresora IL-10. La polarización hacia este subtipo de macrófagos M2 puede ser desencadenada por complejos inmunes, prostaglandinas, células apoptóticas e IL-10. Además, los macrófagos reparadores de tejido o de cicatrización de heridas producen IL-4 y aumentan la actividad de la arginasa-1 (Arg-1), enzima necesaria para la producción de poliaminas y colágeno durante la regeneración del tejido dañado [94, 95]. Entonces, respondiendo tanto a las señales de la inmunidad innata como a los

mediadores producidos por los linfocitos, los fagocitos mononucleares actúan como componentes integrales en las respuestas a patógenos, ejerciendo funciones microbicidas y gatillando eventos de reparación tisular. En cuanto a la infección por *T. cruzi*, la activación de los macrófagos es un paso crucial para controlar la infección. Los macrófagos tipo M1 capaces de erradicar la infección son clásicamente activados por el IFN- γ producido por las células NK en respuesta al parásito [81, 96, 97]. La evidencia más notable del papel de la activación de macrófagos por IFN- γ se reportó en un estudio con animales transgénicos donde los macrófagos son selectivamente deficientes del receptor de IFN- γ por lo cual eran insensibles a IFN- γ (MIIG). La ausencia de respuesta de los macrófagos a IFN- γ conduce a un aumento de la carga parasitaria, un control tardío de la parasitemia y mortalidad temprana, en comparación con ratones control ó salvajes "wild type" (WT) [98]. La activación de los macrófagos desencadena cascadas de señalización intracelular que inducen la transcripción de genes implicados en la producción de citoquinas como TNF, IL-12, y otros mediadores proinflamatorios como NO para amplificar la respuesta inmune, activar y reclutar nuevas células al sitio de infección (Figura 6).

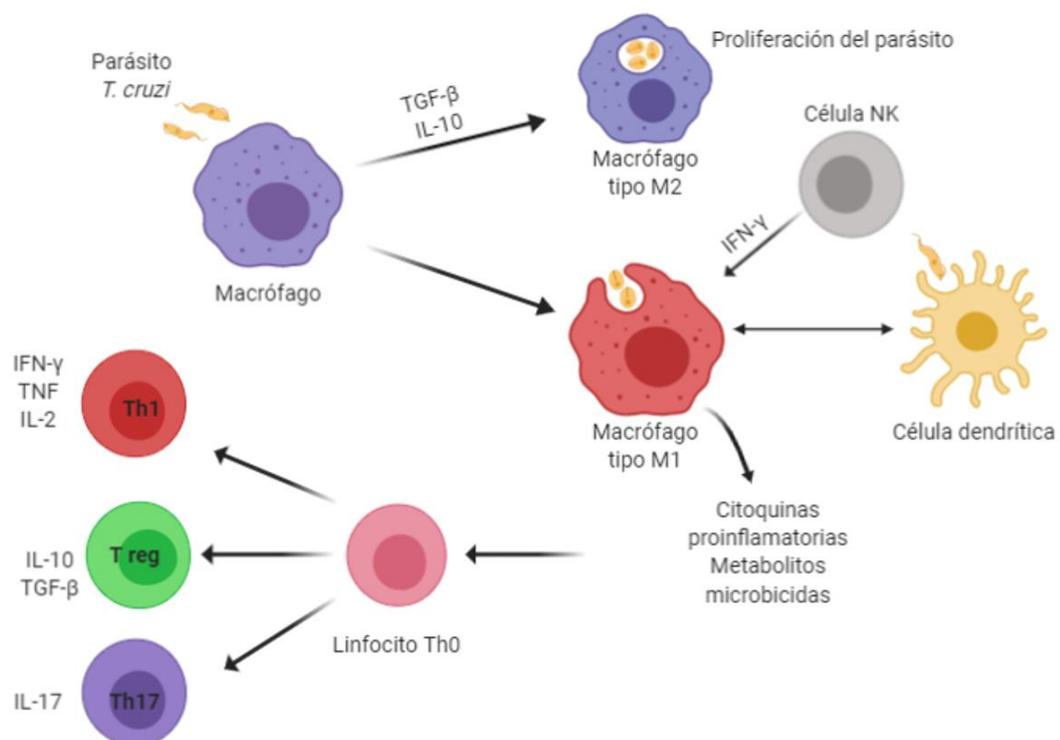


Figura 6. Descripción general del papel central de los macrófagos en la respuesta inmune durante la infección por *T. cruzi*. La erradicación del parásito por parte de los macrófagos requiere la presencia de IFN- γ , producido principalmente por las células NK y células del tejido. Luego de que el parásito es detectado principalmente por los receptores TLR, los macrófagos producen citoquinas

proinflamatorias (principalmente TNF, IL-12), mediadores microbicidas como óxido nítrico (NO), así como varias quimiocinas. Estos mediadores pueden inducir la migración y la activación de células inflamatorias al sitio de infección, que incluyen los monocitos, células NK y linfocitos T. En presencia de células presentadoras de antígenos profesionales activadas como células dendríticas (CD), los linfocitos T reclutados serán principalmente diferenciados a perfiles Th1, Th17 y / o Treg. Las quimiocinas y la IL-12 inducen a las células NK y los linfocitos T para producir IFN- γ , lo que resulta en la activación de macrófagos tipo M1. También pueden producirse otras citoquinas como IL-10 y TGF- β que regulan la respuesta inflamatoria local y la activación de macrófagos hacia un perfil tipo M2, lo que el parásito utiliza como una estrategia de proliferación. *Adaptado de Gutierrez et al- (2011) Chapter 4- Control of Innate and Adaptive Immune Responses during Infectious Diseases (pp.69-84)*

Rol del sistema inmune adaptativo en la respuesta a *T. cruzi*

La respuesta inmune adaptativa se inicia con la activación y proliferación de linfocitos T específicos, entre los cuales se encuentran los linfocitos T CD8+ ó citotóxicos, los linfocitos T CD4+ cooperadores, y linfocitos B encargados de producir anticuerpos y citoquinas. La infección por *T. cruzi* inicia la activación y proliferación de linfocitos T vírgenes o la secreción de moléculas efectoras por parte de los linfocitos T efectoras. La fase de iniciación se produce cuando ocurre la interacción del receptor del linfocito T con los antígenos específicos, los cuales son péptidos derivados del patógeno, que son presentados en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad (CMH) de clase I y II en la superficie de las células dendríticas. Existen otros tipos de células presentadoras de antígeno como los fagocitos mononucleares y los linfocitos B, pero las células dendríticas son las únicas denominadas células presentadoras de antígenos profesionales [99]. Las células presentadoras de antígeno degradan parcialmente proteínas endocitadas o provenientes del citosol convirtiéndolas en péptidos, los cuales son expuestos en la superficie celular en asociación con las moléculas del CMH I o II y presentados a los linfocitos T CD8 y CD4, respectivamente. La frecuencia de linfocitos T capaces de reconocer un determinado epítipo de un antígeno es generalmente muy baja en los individuos que nunca han sido expuestos al mismo, esto se denomina repertorio inmunológico. Durante el primer encuentro con el epítipo antigénico, los linfocitos específicos se expanden clonalmente, aumentando su frecuencia. Durante la proliferación, los clones de linfocitos T cambian su perfil fenotípico y funcional, adquiriendo funciones que son utilizadas cuando el linfocito efector es estimulado nuevamente en los tejidos inflamados, lo cual contribuye a la erradicación del agente patógeno. Los linfocitos T CD8+ activados adquieren capacidad de

destruir células infectadas y producir citoquinas convirtiéndose en células citotóxicas, y los linfocitos T CD4⁺ se pueden diferenciar en distintas poblaciones colaboradoras (Th1, Th2, Th17, T regulatorias entre otras) que presentan diferencias funcionales y regulan la respuesta inmune montada [100]. La eficacia con la cual permiten la erradicación de un posible patógeno, radica en la capacidad de interactuar con diferentes células y moléculas efectoras del sistema inmune [101]. El perfil que adquiere un linfocito T CD4⁺ luego de la activación se caracteriza por un patrón de expresión diferente de receptores, con capacidad de secretar citoquinas particulares, y se definen por la expresión de un factor de transcripción que regula múltiples genes asociados a dicho fenotipo y función. La activación de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes en presencia de IL-6 y TGF- β induce la expresión del factor de transcripción Ror- γ t, generando el subtipo de linfocitos Th17 que producen IL-17, IL-21 y IL-22 ([102]. Estas citoquinas poseen múltiples funciones, dentro de las cuales se destacan el reclutamiento de neutrófilos y la potente activación de los linfocitos B, induciendo la proliferación y el cambio de isotipo. Por otro lado, la activación de linfocitos T CD4⁺ en presencia de TGF- β y ácido retinoico induce la expresión del factor de transcripción FOXP3 el cual es característico de los linfocitos T regulatorios, encargados de inhibir la respuesta inmune y mantener la homeostasis [103]. Durante la erradicación de patógenos intracelulares, como *T. cruzi* y otros, el sistema inmune es capaz de reconocer a la célula infectada mediante linfocitos T CD8⁺, CD4⁺ y células NK, los cuales poseen mecanismos de citotoxicidad para eliminarlas. De esta forma, el sistema inmune evita la generación de grandes cantidades de parásitos ya que al matar a la célula infectada impide la replicación del parásito intracelular. Por otro lado, luego de la activación de linfocitos CD4⁺ vírgenes en presencia de IFN- γ e IL-12/IL-18, se induce la expresión de T-bet, un factor de transcripción que define el linaje Th1 productor de IL-2, TNF, IFN- γ [104]. Estas citoquinas, pueden inducir la proliferación de linfocitos T CD8⁺, la producción de NO por parte de los macrófagos y el cambio de isotipo a IgG1/IgG3 en linfocitos B [105]. En contexto de la infección por *T. cruzi*, el IFN- γ es clave para lograr el control del parásito, ya que promueve el reclutamiento y la activación de células fagocíticas como los macrófagos y neutrófilos, la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos y la activación de linfocitos T CD8⁺ [41]. Como se mencionó anteriormente, el *T. cruzi* es un parásito intracelular, por lo cual, sus antígenos son procesados por el proteasoma y presentados a

los linfocitos T CD8+ en el contexto de las moléculas del CMH-I [106]. Cuando los linfocitos T CD8+ son activados por una célula infectada tienen la capacidad de secretar citoquinas y proliferar e inducir apoptosis en la célula blanco [107]. Durante la etapa final y resolución de una infección aguda, los linfocitos T efectores disminuyen su frecuencia en la fase de contracción, recuperando los valores del estado basal de reposo. En cambio, en la infección crónica, se ha reportado que los linfocitos CD8+ adquieren un estado de disfunción celular al que se denomina agotamiento celular, donde estas células presentan una disminución de sus actividades efectoras y potencial de proliferación e incrementan la expresión de receptores inhibitorios [108]. Estudios recientes revelan un incremento significativo en el perfil de células T cooperadoras Th1, con capacidad proliferativa y disminuida presencia de células T regulatorias en miocardio de pacientes chagásicos crónicos [109]. Estos resultados sugieren que la respuesta de células T y los mecanismos regulatorios podrían determinar la severidad de la enfermedad cardíaca. A pesar de que se ha reconocido que la resistencia del huésped a la infección está ejercida fuertemente por reacciones de inmunidad mediada por estas células [110], los mecanismos por los cuales la respuesta inmune protectora falla en eliminar el parásito a nivel cardíaco aún no se ha establecido. La reducción de la respuesta anti-parasitaria gatillada por las células inmunes tiene directas consecuencias en la persistencia del parásito dentro del miocardio, este evento es central para el desarrollo de la cardiomiopatía crónica [62]. El estado inflamatorio crónico puede resultar de diversas interacciones entre el sistema inmune del huésped-parásito, pudiendo resultar en un grado variable de daño tisular y desarrollo de síntomas clínicos. Entonces, la perpetuación del estado inflamatorio de la enfermedad de Chagas crónica es crítica para la comprensión de la complejidad de la patología clínica, dado que la homeostasis inmunológica en huéspedes infectados crónicamente podría ser alterada tanto por los parásitos como por moléculas y células inmunes del huésped.

Desafíos en el tratamiento terapéutico de la enfermedad de Chagas

En la actualidad, las terapias tripanocidas se limitan al uso de benznidazol y nifurtimox. Estas son efectivas en fase aguda, transmisión congénita y niños con infección crónica; sin embargo, ensayos clínicos recientes han mostrado limitaciones en adultos con infección crónica. Durante la infección aguda, el tratamiento con benznidazol o nifurtimox reduce la duración y severidad de los síntomas clínicos, y disminuye la carga parasitaria [111]. Al

evaluar si la terapia tripanocida previene o reduce la enfermedad cardíaca, modelos experimentales de infección crónica han demostrado que la misma atenúa las consecuencias clínicas de la patología al reducir la carga parasitaria [112]. Sin embargo, años más tarde se comprobó en un ensayo clínico multicéntrico y prospectivo que la terapia tripanocida con benznidazol en pacientes con miocardiopatía de Chagas redujo ampliamente la detección de parásitos en suero, pero no logró reducir significativamente el deterioro clínico cardíaco a 5 años [113]. La decisión médica de indicar el tratamiento a los pacientes crónicos queda supeditada a los diversos efectos secundarios de ambas drogas disponibles hasta el momento, la inexistencia de ensayos de laboratorio que confirmen la erradicación fehaciente del parásito y la eficacia del tratamiento, sumado a la falta de resultados congruentes en ensayos clínicos y reportes en medicina basada en evidencia [114, 115]. El creciente interés en el desarrollo de fármacos para combatir la infección crónica conlleva un aumento significativo en investigación y desarrollo para la búsqueda de blancos terapéuticos. En la actualidad, se están llevando a cabo numerosos ensayos clínicos y pruebas de compuestos a larga escala gracias al aporte y esfuerzo de grandes compañías farmacéuticas, pero no se ha logrado, hasta el momento, encontrar una nueva opción de tratamiento [116-118]. En consecuencia, existe una necesidad urgente de nuevos medicamentos seguros y con eficacia comprobada para luchar contra esta enfermedad compleja [119].

Sistema purinérgico

Sistema de señalización purinérgica

El sistema purinérgico ha sido reconocido como una vía de señalización central para modular la respuesta inmune y prevenir el daño colateral producido por la activación exacerbada del sistema inmune en varias enfermedades, incluidas las patologías cardíacas. La señalización purinérgica se da como consecuencia de una amplia gama de metabolitos, entre los que se encuentran el nucleótido ATP y su metabolito adenosina (ADO), los cuales actúan como señales inmunoestimuladoras o inmunosupresoras, respectivamente, regulando el desarrollo de la respuesta inmune del huésped [120]. En condiciones fisiológicas, el ATP se localiza intracelularmente, donde actúa como principal fuente de energía para diversas funciones celulares como la proliferación, migración, motilidad y biosíntesis de productos metabólicos. Además de su función metabólica, el ATP puede actuar como una molécula proinflamatoria, generando señales de alarma cuando es liberado al compartimento extracelular tras signos de inflamación o infección [121-123]. La hidrólisis extracelular de ATP se rige por la actividad sucesiva de dos ectoenzimas de membrana, la ecto-apirasa CD39 y la 5'-ecto- nucleotidasa CD73 que catalizan la fosfohidrólisis de ATP a adenosina monofosfato (AMP) y de AMP a ADO y fosfato inorgánico, respectivamente (Figura 7). A su vez, ADO puede ser degradada a inosina por parte de la enzima adenosina deaminasa (ADA) [124].

Por su parte, la ADO extracelular representa un mecanismo de retroalimentación reguladora que limita la lesión tisular, al contrarrestar las acciones proinflamatorias del ATP. Debido a sus efectos compensatorios, la ADO ha sido reconocida como un metabolito regulatorio que promueve la homeostasis del tejido, pero también juega un importante rol en la inmunosupresión ya que contrarresta las respuestas microbicidas de las células inmunes [125]. La expresión y actividad enzimática de CD39 y CD73 en células inmunes y parenquimales juega un papel decisivo en la regulación de la magnitud y duración de las señales purinérgicas que modulan la función celular de manera autocrina o paracrina [126].

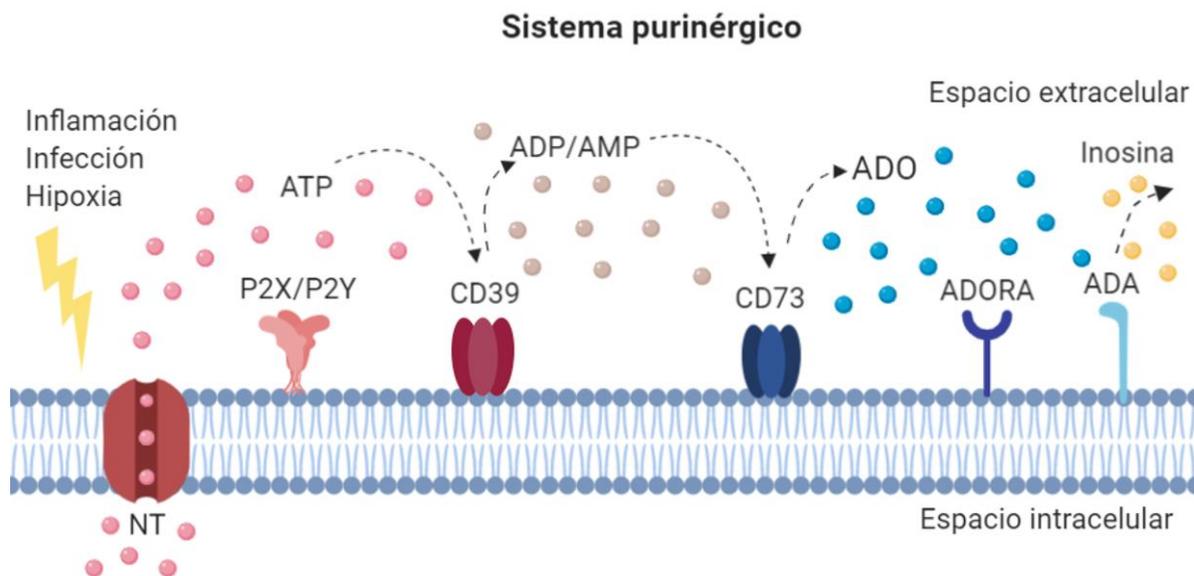


Figura 7. Componentes del sistema purinérgico. Vía de señalización purinérgica en las células inmunes. La estimulación de receptores de superficie específicos de células inmunes que reconocen patógenos, antígenos, citoquinas o quemoquinas desencadena la liberación de ATP a través de canales. El ATP en el espacio extracelular puede estimular los receptores P2X o P2Y. La enzima ectoapirasa CD39 cataliza la hidrólisis de ATP a ADP/AMP y, consecutivamente, la enzima 5'-ectonucleotidasa CD73 catalizan el paso limitante de conversión a adenosina, que es el ligando de los receptores P1. La adenosina (ADO) puede ser eliminada por transportadores de nucleósidos (NT), lo que facilita la absorción celular de adenosina, o por la adenosina desaminasa (ADA), que convierte la adenosina en inosina.

CD39 es una ectonucleotidasa típica codificada por el gen *ENTPD1*, ubicada en la superficie celular y con un sitio catalítico extracelular activo. Es miembro de la familia de ectonucleósidos trifosfato difosfohidrolasa (E-NTPDasa) [127]. Conocida también como NTPDasa1, CD39 cataliza la hidrólisis de los residuos fosfato γ y β de trifosfo y difosfonucleósidos al derivado monofosfonucleósido; es decir, cataliza la hidrólisis de ATP y ADP a AMP. Por otra parte, CD73 es una glucoproteína anclada a GPI expresada de forma ubicua y codificada por el gen *NT5E*. CD73 es la principal enzima que cataliza la formación de adenosina extracelular a partir de AMP [128] y regula funciones críticas en múltiples sistemas de órganos a través de su actividad en diferentes tipos de células [129].

Los efectos de los metabolitos purinérgicos extracelulares producidos están mediados por dos tipos de receptores: receptores P1 activados por ADO extracelular y receptores P2 activados por ATP y otros nucleótidos como ADP y AMP. El primer grupo incluye 4 receptores

de ADO (ADORA 1, ADORA 2A, ADORA 2B y ADORA 3), y el segundo grupo incluye varios subtipos de receptores P2X y P2Y [130]. La señalización purinérgica se describe ampliamente en el contexto tumoral [131] y en enfermedades autoinmunes [132], pero existen pocos reportes en el contexto de patologías cardíacas o infecciosas. Esto debe tenerse en cuenta ya que, debido a la necesidad de mantener el continuo trabajo mecánico cardíaco, el daño tisular de dicho tejido genera la liberación de altas cantidades de ATP al espacio extracelular. Bonner y colaboradores reportaron que en los cardiomiocitos y los eritrocitos no se detecta expresión de la maquinaria catabólica ATP, pero las células endoteliales coronarias fueron altamente positivas para CD39 en condiciones basales y una menor proporción de estas células expresa CD73 [133]. Además, reportaron que las células presentadoras de antígenos (CPA) y los monocitos cardíacos residentes son los responsables del primer paso de degradación de ATP en el corazón después de la lesión isquémica, ya que son altamente positivas para las ectoenzimas CD39 mientras que no expresan CD73. Del mismo modo, el paso de desfosforilación de AMP a la molécula inmunosupresora ADO lo llevarían a cabo los linfocitos T y granulocitos porque CD73 se expresa principalmente en esas poblaciones [133].

La hipoxia como factor desencadenante de la inducción del sistema purinérgico

El factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1) es un complejo heterodimérico, conformado por la subunidad α (HIF-1 α) inducible cuya expresión es regulada por los niveles de oxígeno, estrés oxidativo y citoquinas inflamatorias [134]. La estabilidad de HIF-1 α es regulada por la familia de hidrolasas dependientes de oxígeno. En condiciones de hipoxia, esta actividad hidrolasa se inhibe, por lo que HIF-1 α se acumula y transloca al núcleo, donde se une a HIF-1 β expresado constitutivamente, formándose un complejo con actividad transcripcional. HIF-1 α presenta una variedad de genes blanco que incluyen factores angiogénicos, enzimas glucolíticas, transportadores de glucosa (Glut-1), eritropoyetina, entre otros [135]. Cabe destacar que entre los genes blanco del factor de transcripción HIF-1 se encuentran otros genes que participan de manera activa en la estimulación como en la inhibición de la respuesta inmune.

El flujo de células inmunes al tejido infectado lleva a una disminución de los niveles de oxígeno, lo que gatilla respuestas transcripcionales gobernadas por HIF que incrementan la

expresión de las ectoenzimas CD39 y CD73 expresadas en la superficie de diferentes poblaciones celulares. Ambas ectoenzimas incrementan su expresión en respuesta a la hipoxia con el objetivo de frenar el excesivo daño colateral a la sobre-activación de células inmunes en el tejido inflamado. Estudios *in vivo* en modelos de colitis murina, revelaron que el CD73 inducido por hipoxia sirve para proteger la barrera epitelial [136]. En otro estudio se observó que la disminución de la expresión de HIF-1 se correlacionaba con síntomas clínicos más graves de la enfermedad (mortalidad, pérdida de peso, longitud del colon), mientras que el aumento de los niveles de HIF era protector. Además, los ratones que presentaban activación constitutiva de HIF mostraron niveles aumentados de expresión de genes protectores de barrera del colon regulados por HIF, como por ejemplo CD73, lo que resultaba en un freno del desarrollo de colitis [137]. Por otro lado, estudios realizados en ratones con niveles modificados de HIF-1 α revelan el rol clave de dicho factor en la actividad bactericida de los fagocitos. Los macrófagos de ratones deficientes en HIF-1 α demostraron una capacidad disminuida de matar a bacterias comparado con macrófagos provenientes de animales salvajes. La expresión de un gran número de efectores moleculares involucrados en la defensa innata del huésped se correlacionan con los niveles de HIF-1 α . Entre estos factores se encuentran péptidos antimicrobianos, catepsina G, TNF y NO. Además de sus actividades microbicidas, el NO estabiliza HIF-1 α redistribuyendo el oxígeno intracelular e inhibiendo la actividad de hidrolasas, por lo que este podría ser un mecanismo de amplificación de activación de células mieloides [138]. A su vez, los niveles relativos de HIF-1 α y HIF-2 α pueden desempeñar un papel importante en la regulación del metabolismo del NO al controlar los niveles tanto de iNOS como de arginasa, ambos compiten por el sustrato de L-arginina requerido para la producción de NO. Los macrófagos Hif2 α - / - presentan una inducción normal de iNOS (Nos2) en presencia de hipoxia; sin embargo, tanto la expresión basal como la inducción hipóxica de Arg-1 están disminuidas. Por el contrario, la eliminación de Hif1 α reduce significativamente la inducción de iNOS, pero tiene un efecto menor en la expresión de Arg-1 [139].

Modulación de la respuesta inmune por el sistema purinérgico

Este sistema purinérgico constituye una potente vía regulatoria que, mediante la modulación de los niveles extracelulares de ADO y ATP, regula el microambiente purinérgico y controla finamente la función de las células inmunes [120, 140]. Crecientes líneas de

evidencia demuestran que la maquinaria catabólica de ATP sería clave para contrarrestar las funciones efectoras de las células inmunes innatas y el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa y, por lo tanto, participaría en la conducción de diversos eventos patofisiológicos [141, 142]. La expresión de CD73 se encuentra incrementada en condiciones de hipoxia [136, 143] y en presencia de mediadores pro-inflamatorios como TNF e IL-1 β [144, 145]. Teniendo en cuenta que frente a un medioambiente hipóxico e inflamatorio las células liberan al medio extracelular grandes cantidades de ATP, el cual gatilla efectos microbicidas e inflamatorios pero que es rápidamente degradado a ADO, la acción sucesiva de CD39 y CD73 es capaz de cambiar el microambiente de un estado pro-inflamatorio a uno anti-inflamatorio. Particularmente la diferenciación y actividad de macrófagos, pero también de la inmunidad adaptativa y regulatoria puede ser regulada por medio de la concentración de las purinas. La ausencia de CD39 y CD73 lleva a la acumulación de ATP induciendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF en macrófagos peritoneales [146, 147]. Además, los ratones CD73KO presentan un incremento en la expresión de genes microbicidas tipo M1, mientras que la expresión de genes M2 como Arg-1, IL-10 y TGF- β se encuentran disminuidos. La ausencia de CD73 genera un incremento en los monocitos inflamatorios Ly6C^{alto} y esto se relaciona con la remodelación cardíaca adversa y la dilatación ventricular en un modelo experimental de infarto de miocardio [148].

Por su parte, ADO exhibe diversas funciones inmunosupresoras. Haskó y colaboradores informaron que ADO disminuye el estallido oxidativo regulando negativamente la producción de NO e inhibe la liberación de TNF de monocitos y macrófagos [149]. Además, la estimulación con ADO a través de los receptores ADORA 2A y ADORA 2B en macrófagos promueve el fenotipo M2 [150] e incrementa la producción de IL-10 [151]. Asimismo, se ha reportado en un modelo de isquemia/reperfusión murina que el tratamiento con ADO disminuye la producción de TNF a nivel miocárdico [152] y que mediante la estimulación con agonistas selectivos de ADORA 1, ADORA 2A y ADORA 3 se puede disminuir los niveles séricos de TNF y NO en ratones tratados con LPS [153]. De modo contrario, la deficiencia en la enzima CD39 impide la transición a un estado regulatorio por lo que se continúan produciendo citoquinas pro-inflamatorias en un modelo experimental de sepsis donde un pequeño número de macrófagos con deficiencia de CD39 es suficiente para inducir un shock séptico letal [154].

Antecedentes previos del grupo

Como consecuencia del tropismo del parásito por los cardiomiocitos, los modelos experimentales de infección han sido una herramienta invaluable para estudiar la respuesta inmune desencadenada frente a *T. cruzi* [155-159]. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la inhibición farmacológica transiente de CD73 en ratones BALB/c infectados mejora la progresión de la miocardiopatía chagásica experimental al prevenir el cambio de fenotipo de macrófagos tipo M1 a tipo M2 dentro del miocardio infectado, lo que incrementa la producción de NO y las citoquinas proinflamatorias con la consecuente disminución de la carga parasitaria local [158]. Asimismo, en sangre periférica de pacientes infectados en estadio indeterminado observamos que los monocitos presentaron una mayor frecuencia de expresión de CD39, aunque no presentaban diferencias en el porcentaje de expresión de CD73. Por otra parte, los linfocitos presentaban una menor expresión de CD39 y CD73 en comparación con los donantes control [160, 161].

Actualmente, numerosas evidencias avalan el rol crítico que tendría el sistema purinérgico como uno de los mecanismos que gatillan cambios bioquímicos en las células inmunes modulando la homeostasis de dichas células, e influyendo en la modulación de la respuesta inmune y en la reparación cardíaca como respuesta a injurias. Teniendo en cuenta que la evaluación de la expresión de estas ectoenzimas y los mecanismos que las regulan podrían tener un potencial uso terapéutico en conjunto con los antecedentes descriptos y resultados previos del grupo, se planteó para este trabajo de tesis la siguiente hipótesis y objetivos de estudio.

Hipótesis

La reducción de la respuesta inmune anti-microbiana tiene directas consecuencias en la persistencia del *Trypanosoma cruzi* dentro del miocardio y por ende en el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica crónica. Un potencial sistema regulatorio que controla finamente la función de las células inmunes está constituido por los niveles extracelulares de ADO. Al ser censada por sus receptores en las superficies celulares, ADO presenta una amplia variedad de efectos antiinflamatorios, desactivación de mecanismos microbicidas y un incremento de la tolerancia intrínseca del miocardio a la isquemia-reperfusión. Teniendo en cuenta los antecedentes de nuestro grupo y de otros grupos de investigación que demuestran que CD73, la enzima limitante en la generación de ADO extracelular, sería clave en contrarrestar las funciones efectoras de una gran variedad de células inmunes, la hipótesis que sostiene este trabajo de Tesis es que la enzima regulatoria CD73 tendría un rol importante en el desarrollo y/o la perpetuación de la inflamación y el daño, permitiendo la persistencia del parásito en la enfermedad de Chagas.

El propósito de este trabajo de Tesis se focaliza en el estudio de la respuesta inmune en diferentes tejidos blanco de la infección y cómo es influenciada por los metabolitos purinérgicos a los fines de evaluar si la manipulación de esta vía podría proveer nuevas estrategias para reducir la patología cardíaca en la infección por *T. cruzi*.

Objetivo general

Estudiar el papel del sistema purinérgico en la modulación de la respuesta inmune frente a la infección por *Trypanosoma cruzi* y dilucidar la posible participación en la persistencia del parásito y progresión a la cardiomiopatía chagásica crónica.

Objetivos específicos

1. Determinar el impacto de la ADO extracelular generada por la actividad de CD73 en la modulación de la respuesta inmune y concomitante carga parasitaria en diferentes tejidos diana de la infección por *T. cruzi* en modelo experimental murino.
2. Determinar los niveles extracelulares de los metabolitos purinérgicos que se generan en los diferentes tejidos diana durante la infección murina, analizando el efecto de la actividad de CD73 en el balance local de la liberación de ATP y ADO.
3. Estudiar la correlación que existe entre el sistema purinérgico y el desarrollo de miocarditis en tejido cardíaco de pacientes con enfermedad de Chagas crónica terminal.



CAPÍTULO

RESULTADOS I PARTE A

Impacto de la actividad enzimática de CD73 en la modulación de la respuesta inmune y concomitante carga parasitaria en diferentes tejidos blanco de la infección.

Teniendo en cuenta que el sistema purinérgico determina la respuesta inmune en diferentes escenarios, y considerando que la inhibición farmacológica de CD73 mejora el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica crónica, se plantea como una primera hipótesis de trabajo comprobar si los animales deficientes en la actividad de CD73 son resistentes a la infección con el parásito *T. cruzi*. Así, como primer objetivo se propone “*Determinar el impacto de la ADO extracelular generada por la actividad de CD73 en la modulación de la respuesta inmune y concomitante carga parasitaria en diferentes tejidos blanco de la infección*”.

Para poder llevar a cabo este primer Objetivo Específico se utilizó un modelo de infección experimental empleando ratones hembras de 6-8 semanas de edad considerados controles WT y ratones modificados genéticamente (CD73KO) donde un *neocassette* reemplaza al exón 3 del gen de la ecto-5'nucleotidasa (Nt5e), que suprime la actividad de la enzima CD73. Ambos grupos de base genética C57BL/6, son infectados con 1000 tripomastigotes de la cepa Tulahuen del parásito *T. cruzi* por la vía intraperitoneal. Este modelo murino de infección experimental ha sido implementado por nuestro grupo y otros [159, 162-165], ya que ha demostrado reproducir numerosos aspectos de la enfermedad de Chagas humana y, por lo tanto, ha sido ampliamente empleado para el estudio de mecanismos inmunopatogénicos, sustituyendo en parte, el empleo de muestras de pacientes.

Efecto de la deficiencia en la actividad enzimática de CD73 en la respuesta inmune cardíaca y la carga parasitaria local

Nuestro grupo ha observado previamente que la inhibición farmacológica transiente de CD73 en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* mejora sustancialmente la cardiomiopatía chagásica experimental ya que inhibe el cambio de fenotipo de macrófagos de tipo M1 a los de tipo M2 en el miocardio infectado, aumentando la producción de óxido nítrico (NO) y citoquinas proinflamatorias, disminuyendo así, la carga parasitaria local [158]. Por esto nos propusimos evaluar el efecto de la ausencia de la actividad de CD73 en la respuesta inmune cardíaca a la infección por *T. cruzi* en ratones C57BL/6 genéticamente modificados.

En primer lugar, se evaluó comparativamente la población leucocitaria en el tejido cardíaco de ratones deficientes en la enzima CD73 y controles WT infectados. En las imágenes histológicas del infiltrado cardíaco de leucocitos a 7 y 21 días post-infección (dpi) se puede observar que el tejido cardíaco de los animales CD73KO presenta un infiltrado celular focalizado en comparación con los animales WT que presentan una distribución difusa del infiltrado celular a los 21 dpi (**Figura 1**).

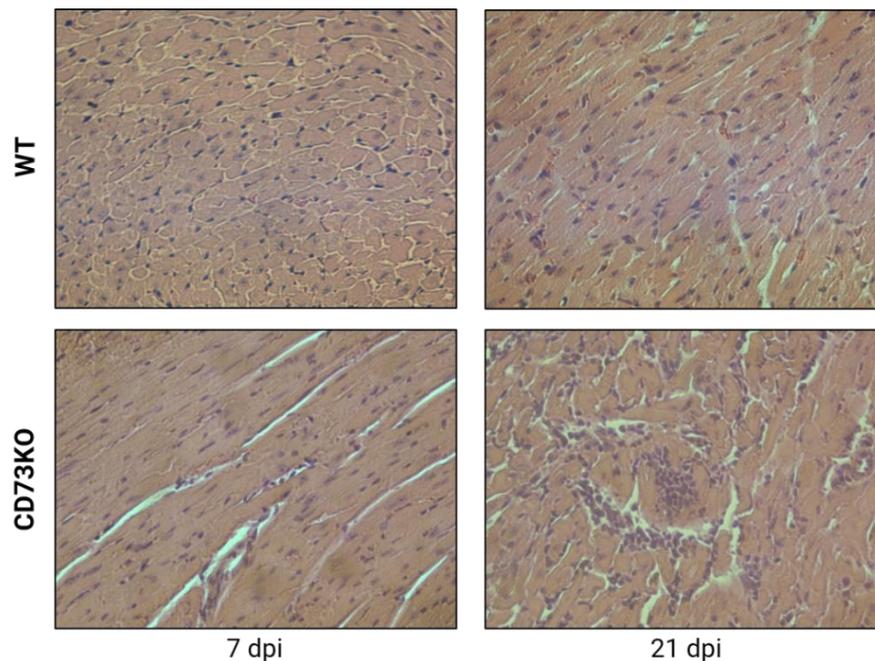


Figura 1. Histología de corazones de ratones infectados con *T. cruzi*. Imágenes representativas de cortes histológicos teñidos con H&E de tejido cardíaco de ratones de las cepas WT y CD73KO infectados a 7 y 21 dpi (400X).

Al cuantificar la frecuencia de las diferentes poblaciones leucocitarias, caracterizadas por la expresión de CD45, en tejido cardíaco, se observó que los macrófagos (F4/80+; círculos) fueron la población más frecuente a tiempos tempranos post-infección (7 dpi), evidenciando una mayor frecuencia en animales CD73KO (líneas grises) en comparación con los WT (líneas negras) ($p < 0.01$). Esta población disminuyó progresivamente, mientras el número de linfocitos T (CD3+; cuadrados) aumentó en días posteriores de la fase aguda (21 dpi). Los neutrófilos (Ly6G+; triángulos) presentaron una disminución significativa en su frecuencia de 7 dpi a 21 dpi en animales CD73KO, pero no se observan diferencias significativas en animales WT (**Figura 2A**).

A pesar de los importantes cambios observados en la frecuencia de las diferentes poblaciones leucocitarias, no se detectaron modificaciones en el número absoluto de leucocitos en tejido cardíaco en ambos grupos de ratones (**Figura 2B**).

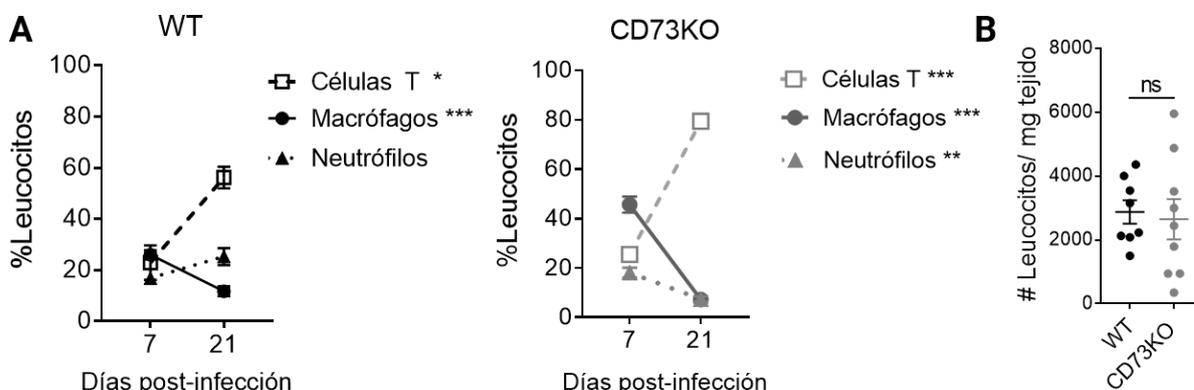


Figura 2. Determinación de población de células inmunes de tejido cardíaco en ratones infectados con *T. cruzi*. (A) Porcentaje de macrófagos (CD45+ F4/80+; círculos), neutrófilos (CD45+ Ly6G+, triángulos) y linfocitos T (CD45+ CD3+; cuadrados) en tejido cardíaco WT (negro) y CD73KO (gris) a diferentes días post-infección (n = 5). El análisis estadístico compara 7 vs. 21 dpi en cada subpoblación. (B) Número absoluto de leucocitos normalizado por mg. de tejido cardíaco en ratones CD73KO y WT a 21 dpi (n=8-9). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: no significativo)

Para poder evaluar la cinética de las diferentes subpoblaciones de macrófagos presentes en tejido cardíaco infectado, se llevó a cabo la estrategia de análisis de citometría de flujo representada en la **Figura 3**.

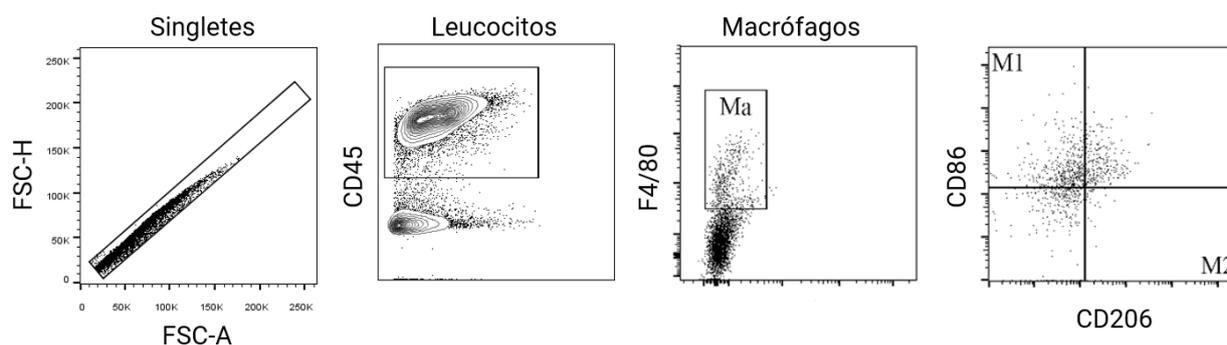


Figura 3. Estrategia de gates de citometría de flujo para la evaluación de macrófagos cardíacos. Después de la selección de singletes mediante el uso FSC-H vs. FSC-A, los leucocitos se identificaron mediante la expresión de el marcador panleucocitario CD45. Los macrófagos fueron seleccionados mediante la tinción de F4/80 y las subpoblaciones fueron evaluadas en base a la expresión de CD206 y CD86 como macrófagos tipo-M1 (F4/80+ CD86+ CD206-) y tipo-M2 (F4/80+ CD86- CD206+).

Los leucocitos fueron seleccionados positivamente por la expresión del marcador panleucocitario CD45, luego de excluir dobletes y debris celular a los fines de eliminar células dañadas o adheridas entre sí. La población de macrófagos fue seleccionada por la expresión del marcador F4/80, la que a su vez fue subclasificada en macrófagos inflamatorios con fenotipo tipo M1 (CD45+ F4/80+ CD86+ CD206-) y macrófagos antiinflamatorios con fenotipo tipo M2 (CD45+ F4/80+ CD86- CD206+).

En tejido cardíaco de ratones CD73KO se observó un incremento progresivo en el número de leucocitos, que alcanzó un máximo a los 21 dpi (**Figura 4A**). Asimismo, este incremento se vio reflejado en el número absoluto de macrófagos en tejido cardíaco que también presentó su pico a 21 dpi (**Figura 4B**). En esa misma línea, a los 21 dpi, se observó un aumento en la frecuencia de macrófagos tipo M1 y una disminución en los macrófagos tipo M2 en el tejido cardíaco deficiente en la actividad enzimática de CD73 en comparación con el mismo tejido WT (**Figura 4C**).

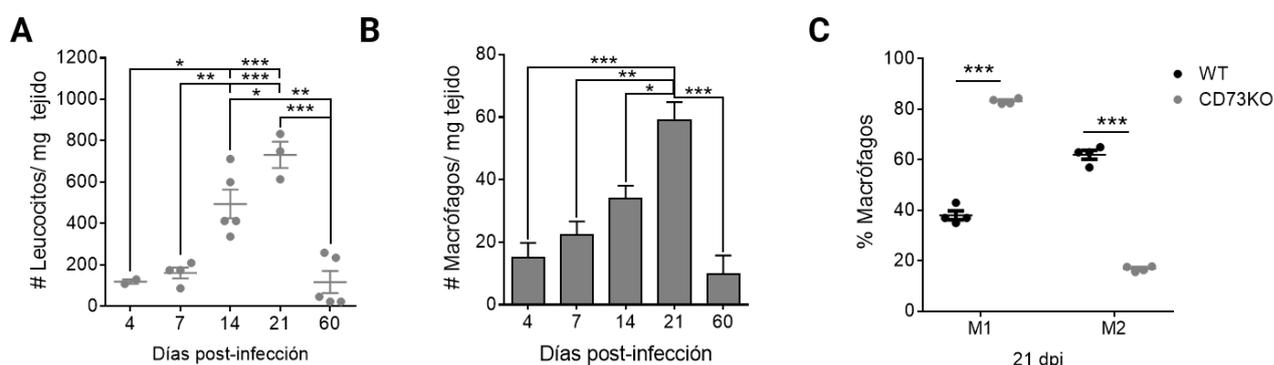


Figura 4. Caracterización de macrófagos cardíacos en ratones infectados con *T. cruzi*. Cinética de número absoluto de (A) leucocitos y (B) macrófagos normalizado por mg de tejido cardíaco en animales CD73KO (n=3-5). (C) Frecuencia de macrófagos cardíacos M1 y M2 en ratones WT (n = 4) y CD73KO (n = 5) a 21 dpi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Para establecer la cinética de las subpoblaciones de macrófagos cardíacos en los animales deficientes en la actividad enzimática de CD73, se analizó el porcentaje de macrófagos tipo M1 y tipo M2 relativizado al total de macrófagos en estas dos subpoblaciones durante 60 dpi. Previamente nuestro grupo ha reportado que inmediatamente después de la infección por *T. cruzi* (4 dpi), el porcentaje de macrófagos cardíacos con fenotipo M1 predominaba

sobre la subpoblación de macrófagos tipo M2, pero, tan pronto como a los 7 dpi, la población de macrófagos tipo M1 disminuía mientras que la subpoblación de macrófagos con fenotipo M2 aumentaba fuertemente y se mantenía constante durante toda la fase aguda y crónica de la infección. Esta cinética se reproducía tanto en miocardio de ratones WT de las cepas BALB/c como de la cepa C57BL/6 [158, 159]. Por el contrario, en los ratones CD73KO infectados se observó que el porcentaje y el número absoluto de macrófagos cardíacos con fenotipo M1 predominaron sobre los macrófagos con fenotipo M2 durante toda la fase aguda (**Figura 5**).

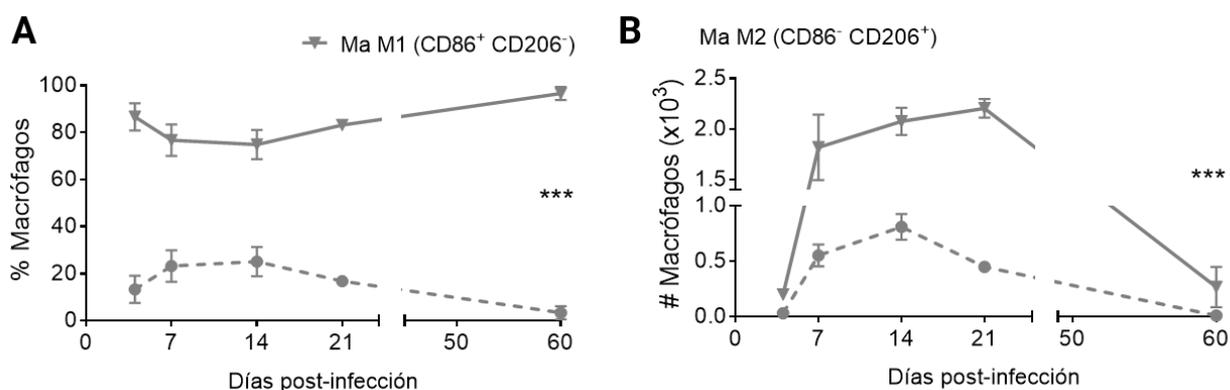


Figura 5. Perfil fenotípico de macrófagos cardíacos en ratones CD73KO infectados con *T. cruzi*. Cinética de porcentaje relativo (**A**) y número absoluto (**B**) de macrófagos con fenotipo M1 y M2 en corazones CD73KO infectados con *T. cruzi*. Los porcentajes se expresan como la relación entre ambas subpoblaciones únicas (***) $p < 0.001$).

Estos resultados están en línea con nuestros resultados previos que demostró que la inhibición farmacológica de la actividad enzimática de CD73 impide el cambio de fenotipo M1 a M2 en los macrófagos cardíacos tempranamente en la fase aguda de la infección experimental con *T. cruzi* [158].

Dado que los macrófagos tipo M1 ejercen su actividad antimicrobiana a través de la producción de NO, un potente metabolito microbicida [93], se determinaron los niveles de NO en lisado de tejido cardíaco infectado. En concordancia con el aumento de los macrófagos tipo M1 en los animales CD73KO, los niveles cardíacos de NO aumentaron significativamente a 21 dpi en comparación con los ratones WT, sin observarse diferencias significativas en los demás puntos evaluados de la cinética (**Figura 6**).

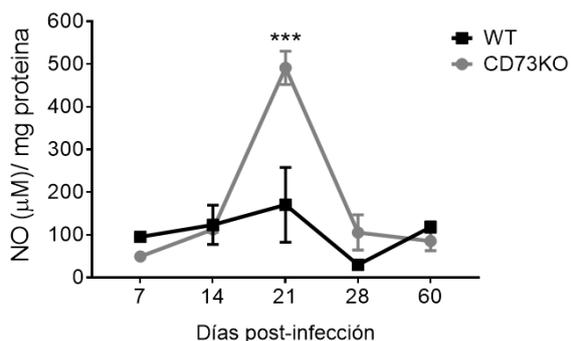


Figura 6. Niveles de NO en tejido cardíaco infectado. (A) Cinética de los niveles cardíacos de NO cuantificados mediante la reacción de Griess en ratones WT (línea negra) y CD73KO (línea gris) infectados (n=3-4 por grupo) (***) $p < 0.001$.

En línea con esta observación, la frecuencia de macrófagos tipo M1 que expresan la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) aumentó significativamente en el tejido cardíaco CD73KO en comparación con WT. Además, la frecuencia de macrófagos tipo M1 que producen la citoquina pro-inflamatoria IL-12 (que dirige la respuesta Th1) se encontraba incrementada en el tejido cardíaco deficiente en la enzima CD73 comparado con su contraparte WT. De igual manera, la producción de IL-12 por célula, medida como intensidad de fluorescencia media (MFI), se encontraba incrementada en la población de macrófagos tipo M1 de ratones CD73KO con respecto a los WT (**Figura 7A**). En contraste, el porcentaje de macrófagos con fenotipo M2 que expresan arginasa-1 (Arg-1) e IL-10 se encontró significativamente disminuido en el tejido cardíaco CD73KO en comparación con los WT, mientras que no se observaron diferencias en la MFI de IL-10 en células tipo M2 en ambos grupos de ratones estudiados (**Figura 7B**).

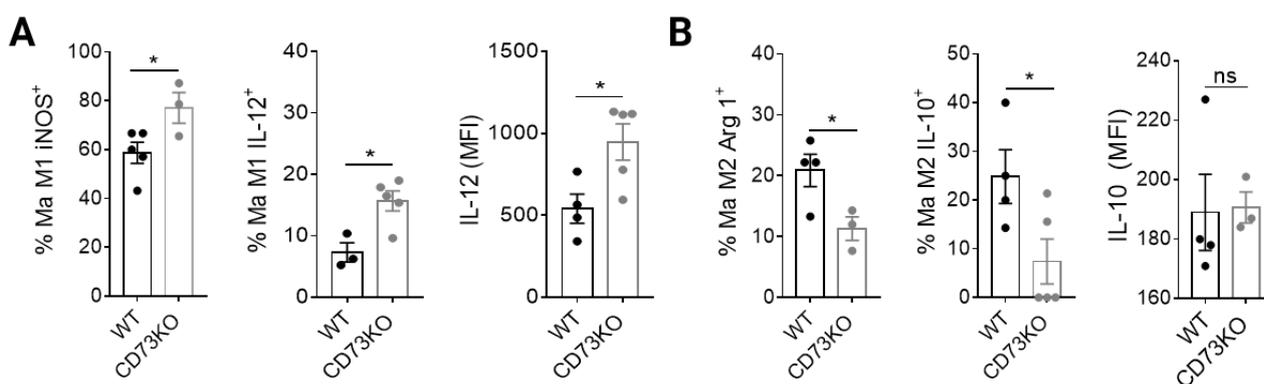


Figura 7. Características funcionales de macrófagos cardíacos. (A) Frecuencia de macrófagos (Ma) M1 iNOS⁺ e IL-12⁺ (n= 4-5). Intensidad de fluorescencia media (MFI) de IL-12⁺ en Ma M1 a 21 dpi (n = 4-5). **(B)** Frecuencia de Ma M2 Arg-1⁺ e IL-10⁺ (n = 3-5) y MFI de IL-10 en Ma M2 en corazones de ratones WT (negro) y CD73KO (gris) a 21 dpi (n = 4-5). (* $p < 0.05$; ns: no significativo).

Teniendo en cuenta estos resultados, es posible pensar que la deficiencia en la actividad enzimática de CD73 favorece la generación de un microambiente proinflamatorio en el tejido cardíaco que podría llevar a una respuesta inmune adaptativa desviada hacia un perfil de células Th1.

En este sentido, se evaluó si la respuesta adaptativa mediada por linfocitos T favorecía el desarrollo de un perfil pro-inflamatorio Th1. En efecto, la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ productores de IFN- γ se encontraba significativamente incrementada en tejido cardíaco de animales CD73KO infectados con respecto al de animales WT a 21 dpi. Sin embargo, no se observaron diferencias en la MFI de IFN- γ en la población mencionada entre ambos grupos (**Figura 8A**). De igual manera, la frecuencia de los linfocitos T CD8⁺ que expresaban CD107a (marcador de degranulación) y la expresión de CD107a por célula (MFI) se encontraba aumentada en los animales CD73KO con respecto a los animales WT a 21 dpi (**Figura 8B**).

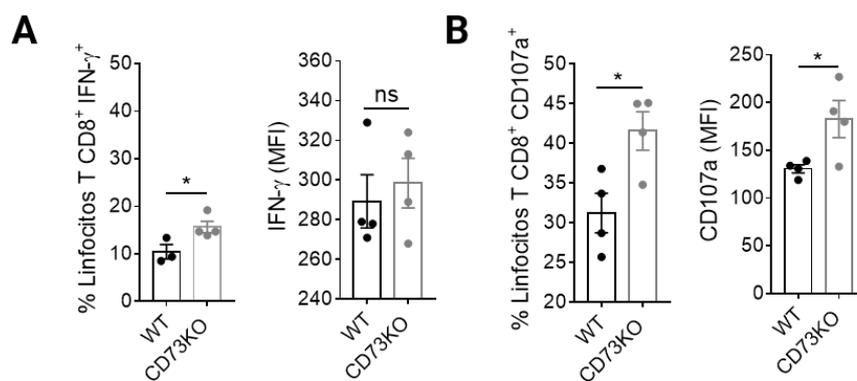


Figura 8. Caracterización de la respuesta de linfocitos T CD8⁺ cardíacos. Frecuencia e intensidad de fluorescencia media (MFI) de linfocitos T CD8⁺ productores de (A) IFN- γ y que expresan (B) CD107a⁺ (marcador de degranulación) en corazones de ratones WT (negro) y CD73KO (gris) a 21 dpi (n = 4). (* p < 0.05; ns: no significativo).

Por otra parte, se evaluó la producción de la citoquina pro-inflamatoria (IFN- γ) y anti-inflamatoria (IL-10) por células T CD4 cooperadoras. Como se puede observar en la **Figura 9A y 9B**, no se observaron diferencias significativas entre ambas cepas de ratones en la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ y de IL-10. Además, la MFI de IFN- γ e IL-10 en la población de células T CD4⁺ no se modificó por la ausencia de la actividad enzimática de CD73.

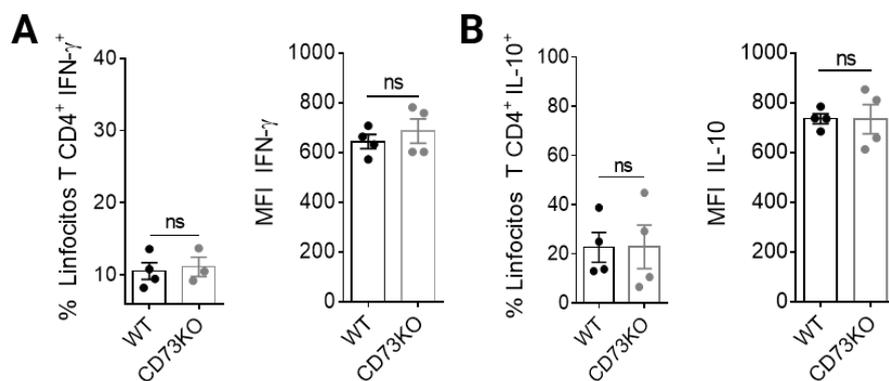


Figura 9. Caracterización de la respuesta de linfocitos T CD4⁺ cardíacos. Frecuencia e intensidad de fluorescencia media (MFI) de células T CD4⁺ productoras de **(A)** IFN- γ e **(B)** IL-10⁺ en corazones de ratones WT (negro) y CD73KO (gris) a 21 dpi (n = 4) (* $p < 0.05$; ns: no significativo)

Considerando los numerosos reportes que describen que la expresión de CD73 en las células T regulatorias murinas y humanas mejora la función regulatoria a través de la producción de ADO y la supresión de la producción de citoquinas pro-inflamatorias [166-168], se evaluó si los animales CD73KO presentaban alteración en esta población de células inmunes regulatorias en el marco de la infección con *T. cruzi*.

Las células T regulatorias, definidas como CD45⁺ CD4⁺ FOXP3⁺, no presentaban cambios en su frecuencia relativa en tejido cardíaco de ambos grupos de ratones. Del mismo modo, no se encontraron diferencias significativas en la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 por parte de esta población de linfocitos T CD4⁺ regulatorios, y no se observaron cambios en la MFI de IL-10 en dicha población entre ambos grupos experimentales (**Figura 10**). En conjunto, estos resultados demuestran que la ausencia de actividad de la ectoenzima CD73 no altera la respuesta por parte de los linfocitos T CD4⁺ regulatorios.

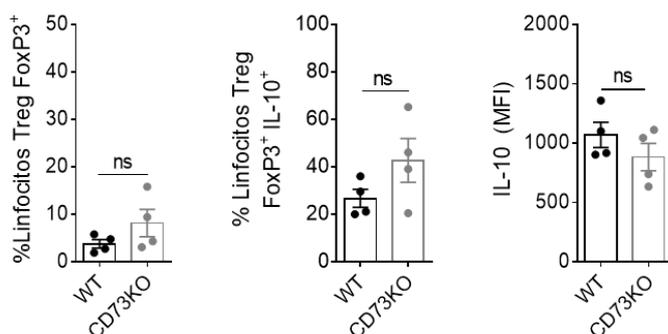


Figura 10. Evaluación de linfocitos T regulatorios. Frecuencia de linfocitos T regulatorios (CD45⁺ CD4⁺ FOXP3⁺), frecuencia e intensidad de fluorescencia media (MFI) de células T CD4⁺ FOXP3⁺ que producen IL-10 en tejido cardíaco de animales WT (negro) y CD73KO (gris) a 21 dpi (n=4) (ns: no significativo).

Teniendo en cuenta que las citoquinas desempeñan un papel importante en orquestar la respuesta intrínseca al daño cardíaco, siendo críticos mediadores que llevan a la activación local de las células en el miocardio, decidimos caracterizar la cinética de las citoquinas en el microambiente cardíaco de ambos grupos de ratones. Para ello, los disgregados de tejido cardíaco en buffer RIPA en condiciones basales no infectado (día 0) o a diferentes días post-infección fueron procesados por la técnica de ELISA.

Como se muestra en la **Figura 11**, se observó que los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias, como TNF e IL-1 β alcanzaron un máximo a 21 dpi, mientras que los niveles de IL-12, la citoquina responsable de la polarización hacia un perfil Th1, se mantuvieron incrementados entre 14 y 28 dpi en comparación con las condiciones basales no infectadas en animales CD73KO. Del mismo modo, TNF, IL-1 β e IL-6 aumentaron a 21 dpi en el corazón deficiente en CD73 en comparación con los corazones WT. Además, IL-6 incrementó a 21 dpi en ratones CD73KO infectados en comparación con su contraparte no infectada. Sorprendentemente, se observaron dos picos de IFN- γ en los primeros tiempos después de la infección (4 dpi) y más tarde en la fase aguda (21 dpi) en corazones deficientes en CD73 en comparación con las condiciones basales. Asimismo, IFN- γ presentó un incremento significativo a 4 dpi en los corazones CD73KO en comparación con los corazones WT, lo cual se correlaciona con la rápida polarización hacia un perfil de macrófagos M1 en los animales deficientes en la ectoenzima.

Por su parte, IL-4, citoquina asociada a un perfil de macrófagos M2, se mantuvo constante en los corazones CD73KO en el período de tiempo evaluado, con niveles incrementados a 4 dpi con respecto a su contraparte WT. Coincidente con el cambio hacia el fenotipo de macrófagos tipo M2 descrito anteriormente, la IL-4 disminuyó de día 0 a 4 dpi ($p < 0.05$) pero aumentó sustancialmente a 7 dpi en corazones infectados WT ($p < 0.05$) pudiendo ser este factor el desencadenante del cambio de fenotipo de macrófagos de M1 a M2 descrito previamente en reportes del grupo [158, 159]. La citoquina anti-inflamatoria IL-10 presentó un aumento significativo en el período agudo temprano luego de la infección en comparación con la condición no infectada (4 y 7 dpi) en ambos grupos de ratones.

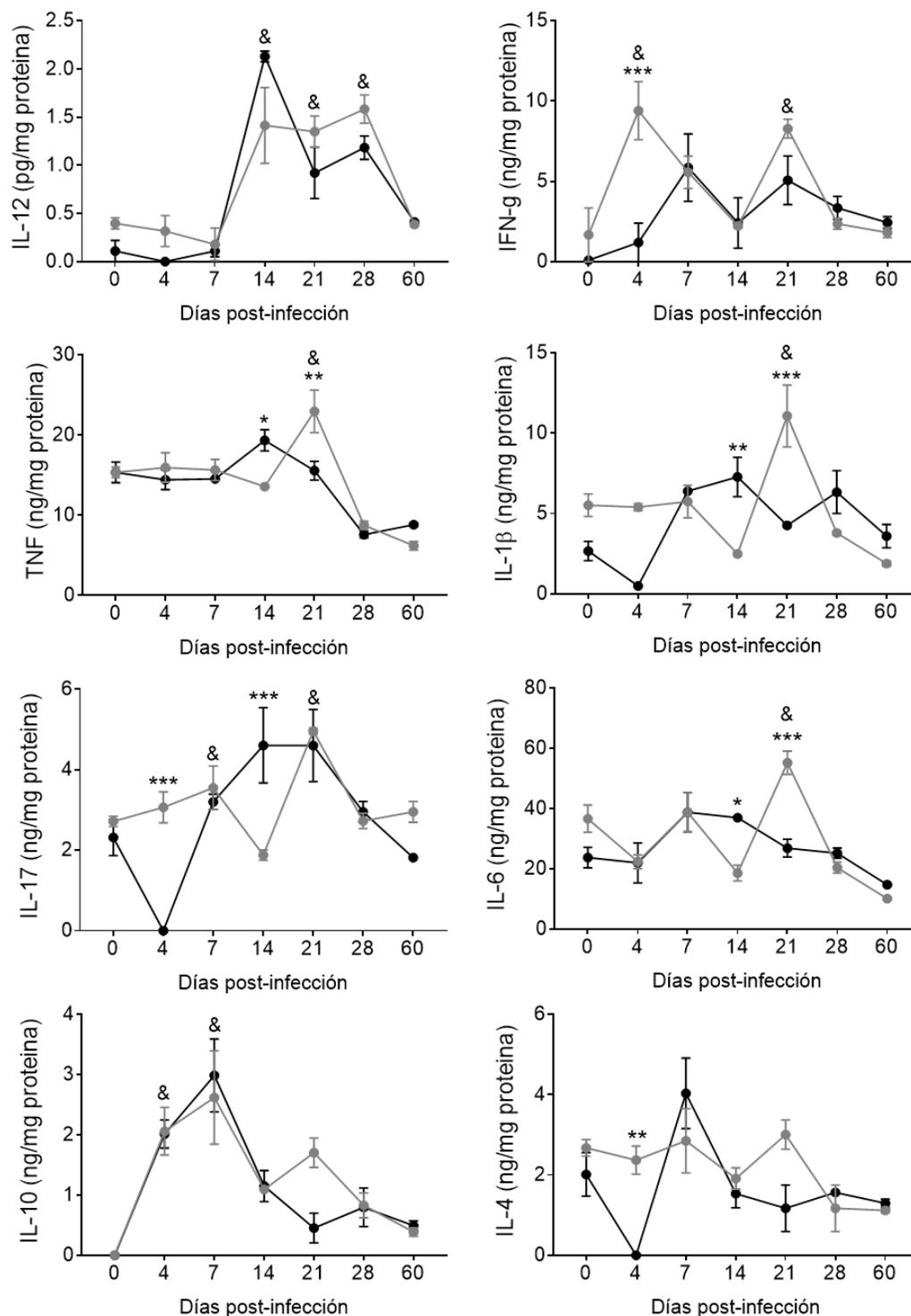


Figura 11. Evaluación de la cinética de citoquinas en tejido cardíaco. Cuantificación de concentración de citoquinas mediante ensayo de ELISA en corazones de ratones WT (líneas negras) y CD73KO (líneas grises) (n=3-6). La concentración se informa en ng ó pg normalizada por miligramos de proteína de tejido cardíaco. Se aplicó el análisis estadístico comparando animales infectados con no infectados (0 dpi) (& $p < 0.05$) o entre los grupos de ratones (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Estos resultados sugieren que la anulación de la actividad de CD73 promueve un medioambiente de citoquinas que favorece el sostenimiento de un fenotipo pro-inflamatorio de los macrófagos con la consecuente desviación hacia un perfil tipo M1. Además, los ratones deficientes en la enzima CD73 infectados montan una respuesta de citoquinas pro-inflamatorias más robusta a nivel local en la etapa aguda.

Una consecuencia directa de la actividad de la inmunidad innata y adaptativa es la reducción del parasitismo tisular. En este sentido, se observó que, en concordancia con una mayor respuesta pro-inflamatoria/microbicida, la carga parasitaria cardíaca disminuyó significativamente en ratones CD73KO en comparación con los ratones WT (**Figura 12**). Estos resultados refuerzan la idea de que la ausencia de la enzima CD73, encargada de la producción de ADO, fomenta la erradicación aguda de los parásitos en el tejido cardíaco, y corrobora nuestras observaciones previas donde demostramos que la inhibición de CD73 promueve un efectivo microambiente antiparasitario.

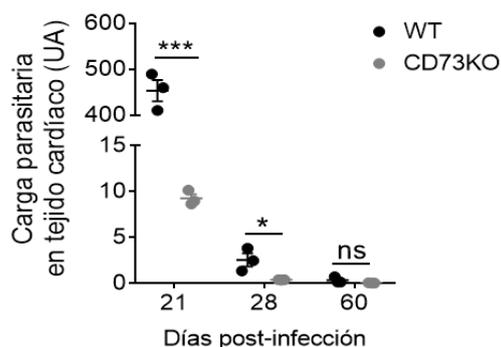


Figura 12. Evaluación de carga parasitaria cardíaca. Evaluación cuantitativa de la carga parasitaria en tejido cardíaco de ratones WT y CD73KO mediante RT-PCR (n= 3-5). Los resultados se expresan como la media \pm SEM de al menos dos experimentos independientes (* $p < 0.05$; *** $p < 0,001$; ns: no significativo).

Al comparar los biomarcadores de daño cardíaco no se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de creatina quinasa (CK) total y de la isoenzima CK-MB (**Figura 13**) entre los grupos experimentales, lo que sugiere que ambos grupos de ratones experimentan un daño miocárdico comparable. Estos resultados sugieren que la mayor respuesta microbicida montada en los animales CD73 reduce la carga parasitaria local, pero genera un daño colateral similar a la experimentada por el tejido miocárdico WT que alberga mayor desarrollo parasitario.

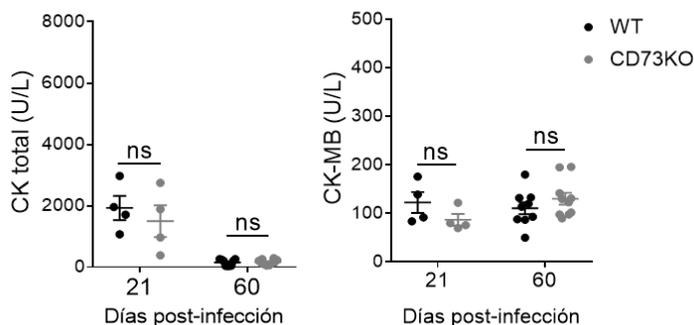


Figura 13. Determinación de marcadores bioquímicos de daño cardíaco. Determinación de CK total e izoenzima CK-MB en plasma de ratones WT (negro) y CD73KO (gris) a 21 y 60 dpi (n =4-9). (ns: no significativo).

Los datos demuestran que la ausencia de ADO generada por la deficiencia en la actividad enzimática de CD73 promueve una respuesta inmune cardíaca proinflamatoria y microbicida asociada con una reducción de la carga parasitaria local.

Impacto de la deficiencia de CD73 en la parasitemia y monocitos circulantes

Considerando los resultados obtenidos a nivel cardíaco se propuso estudiar comparativamente la parasitemia. Contrariamente a lo esperado, los ratones CD73KO presentaron una parasitemia significativamente mayor en comparación con los ratones WT en la etapa aguda (**Figura 14 A**). Esto se asoció con menores niveles plasmáticos de NO en los ratones deficientes en la enzima CD73 comparado con los animales WT que presentaban menor parasitemia y mayores niveles de NO en plasma a 21 dpi (**Figura 14 B**).

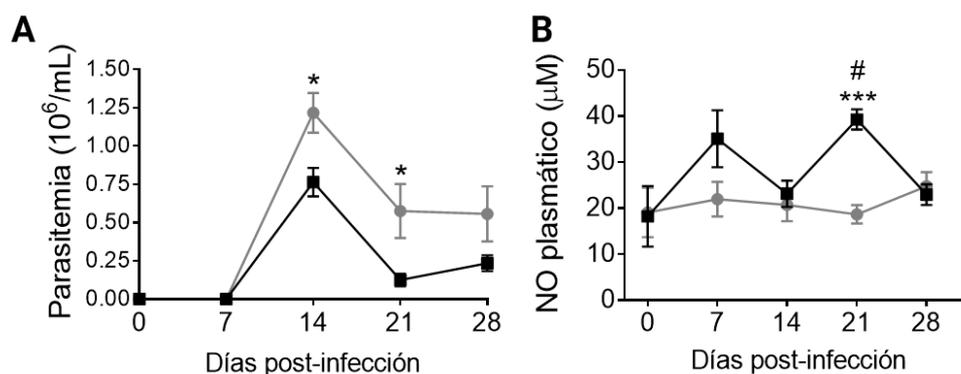


Figura 14. Determinación de parasitemia y niveles plasmáticos de NO. (A) Cinética de parasitemia (número de parásitos /ml de sangre periférica) (n= 4-6). Ensayo representativo de tres ensayos independientes. (B) Cinética de niveles plasmáticos de NO en ratones WT (líneas negras) y CD73KO (líneas grises) infectados con *T. cruzi* (n= 3-4 animales por grupo). Se aplicó el análisis estadístico comparando animales WT infectados con no infectados (0 dpi) (# $p < 0.05$) o entre los grupos de ratones (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

Teniendo en cuenta que los monocitos inflamatorios reclutados al tejido infectado podrían ser la fuente de macrófagos pro-inflamatorios con perfil tipo M1 [86], analizamos si la deficiencia de la actividad de la enzima CD73 también podría estar modulando las subpoblaciones de monocitos circulantes.

La sangre periférica de ratones CD73KO mostró un aumento significativo de la frecuencia de monocitos inflamatorios, caracterizados como células CD11b⁺ Ly6C^{alta}, en los primeros días luego de la infección (7 dpi) en comparación con los ratones WT, aunque en ambos grupos de ratones la mayoría de los monocitos circulantes pertenecen a la subpoblación de monocitos de patrullaje, caracterizados como células CD11b⁺ Ly6C^{media}. A 14 dpi, no se observaron cambios significativos en las subpoblaciones de monocitos en ambos grupos experimentales. Sin embargo, las diferencias se revirtieron a 21 dpi, donde los animales WT presentaron una mayor frecuencia de monocitos inflamatorios en comparación con los ratones CD73KO (**Figura 15 A**). No se observaron diferencias significativas en cuanto a las frecuencias de monocitos inflamatorios productores de especies reactivas del oxígeno (ROS) y nitrógeno (NO) entre ambos grupos de ratones a 21 dpi (**Figura 15 B**). Estos resultados llevan a pensar que los monocitos inflamatorios circulantes de animales CD73 podrían estar extravasando a los tejidos infectados en tiempos tempranos de la infección.

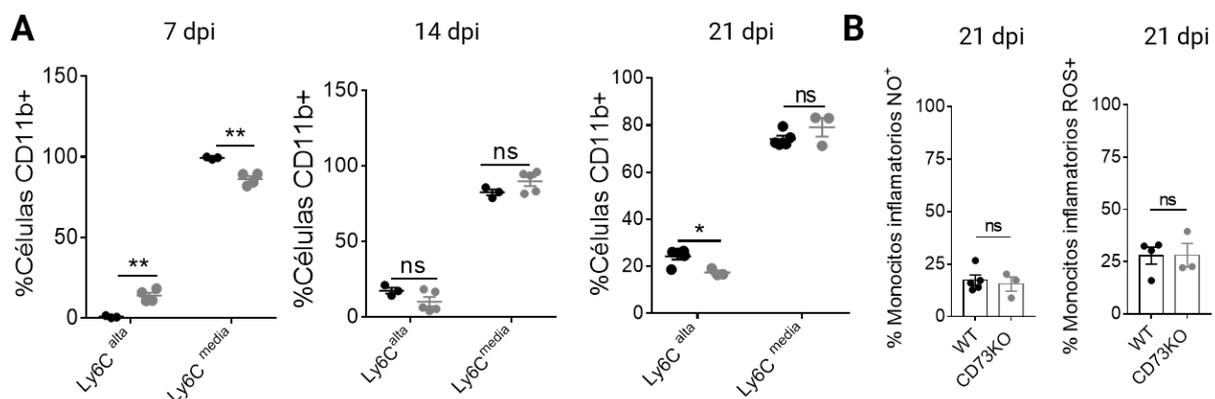


Figura 15. Caracterización de monocitos de sangre periférica. (A) Porcentaje de monocitos inflamatorios (CD11b⁺ Ly6C^{alta}) y patrullaje (CD11b⁺ Ly6C^{media}) en sangre periférica de ratones WT (barras negras) y CD73KO (barras grises) infectados a 7, 14 y 21 dpi (n= 4-5). **(B)** Porcentaje de monocitos inflamatorios productores de especies reactivas del nitrógeno (NO) y especies reactivas del oxígeno (ROS) en sangre periférica de ratones WT (negro) y CD73KO (gris) infectados a 21 dpi. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns: no significativo).

Para determinar si la infección por *T. cruzi* modulaba los niveles de metabolitos extracelulares se compararon los niveles de ATP en plasma de ratones WT y CD73KO. Si bien no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de ATP de ratones deficientes en CD73 en estado basal y luego de la infección (**Figura 16A**), se observó una disminución significativa en los niveles de ATP plasmático en los ratones WT infectados (7 dpi) en comparación con los valores en estado basal, lo que sugiere que el consumo de ATP puede deberse a la acción sucesiva de las ectoenzimas CD39 y CD73. Cabe destacar que no se observaron cambios significativos de niveles de ATP plasmático entre ambos grupos de ratones en la cinética evaluada. De hecho, la expresión de ambas ectoenzimas se encontraba incrementada en la subpoblación de monocitos inflamatorios de animales WT infectados (7 dpi) en comparación con los animales WT no infectados (**Figura 16B**).

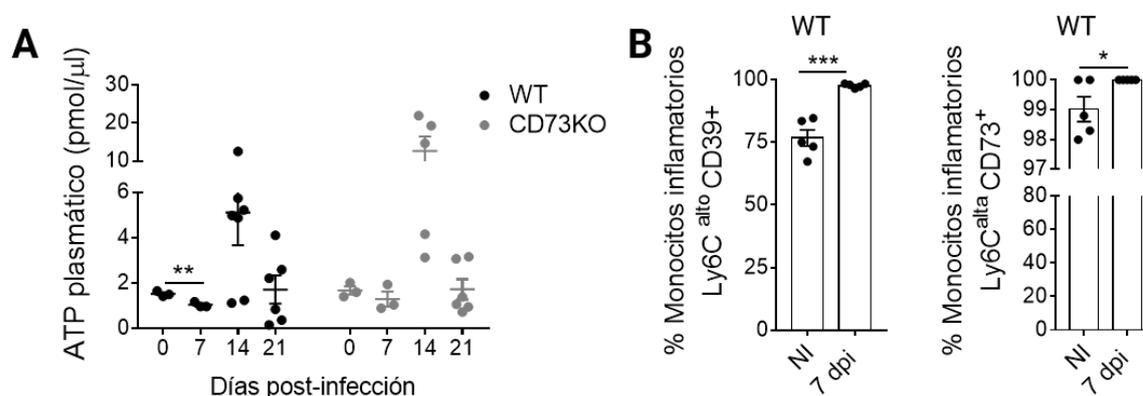


Figura 16. Expresión de enzimas del sistema purinérgico en monocitos inflamatorios y cuantificación de ATP plasmático. (A) Cinética de niveles plasmáticos de ATP (pmol/μl de plasma) medidos en ratones WT (puntos negros) y CD73KO (puntos grises) (n= 5). **(B)** Frecuencia de monocitos inflamatorios (CD11b+ Ly6C^{alta}) CD39+ y CD73+ en sangre periférica de ratones WT no infectados (NI) e infectados (7 dpi) (n= 5) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Efecto de la ausencia de ADO dependiente de la actividad enzimática de CD73 en la carga parasitaria de tejido adiposo y la respuesta inmune local

Considerando que el TAV puede ser utilizado por *T. cruzi* como reservorio en donde el parásito se replica evadiendo la respuesta inmune microbicida del huésped [169], se investigó el impacto de la deficiencia en la actividad enzimática de CD73 en este tejido blanco de infección.

Los ratones CD73KO mostraron un incremento significativo en la proporción relativa del peso de TAV en relación al peso corporal en condiciones basales con respecto a los ratones WT (**Figura 17A**). Luego de la infección, ambos grupos presentaron una disminución significativa de la relación peso TAV/corporal observándose el mínimo peso a 21 dpi. La reducción de los depósitos de grasa visceral en los ratones CD73KO puede observarse en las fotos representativas en estado basal y luego de 21 días post-infección de la **Figura 17 B**. No se observaron diferencias significativas en el tamaño y área de los adipocitos en el TAV de animales CD73KO en condiciones basales en comparación con los animales WT (**Figura 17 C**), como también puede observarse en las imágenes representativas de TAV en condición basal de ambos grupos de ratones en la **Figura 17 D**.

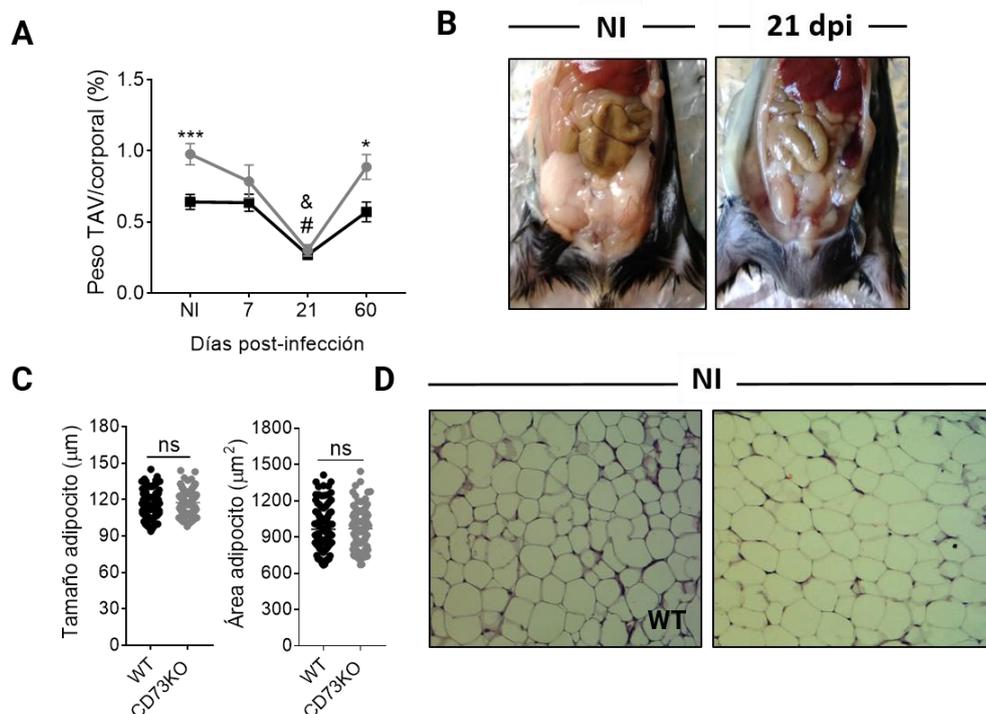


Figura 17. Caracterización de TAV. (A) Cinética de la relación peso TAV/corporal en ratones no infectados (NI) o infectados WT (línea negra) y CD73KO (línea gris) a diferentes días post-infección (n= 8-12) (& $p < 0.001$ NI vs. 21 dpi CD73KO y # $p < 0.01$ NI vs. 21 dpi WT). (B) Fotografías representativas de TAV en animales CD73KO en condición no infectada (NI) y 21 dpi. (C) Tamaño y área de los adipocitos de los ratones WT (negro) y deficientes en CD73 (gris) no infectados. (D) Imágenes representativas de TAV basal (NI) teñido con H&E de animales WT y CD73KO (400X). (* $p < 0.05$; *** $p < 0,001$; ns: no significativo).

Por consiguiente, es posible pensar que el mayor desarrollo que presenta TAV basalmente en ratones deficientes en la actividad enzimática de CD73 representa una ventaja para albergar al parásito en éste órgano blanco. En efecto, se observó un marcado incremento en carga parasitaria en TAV de animales CD73KO en comparación con su contraparte WT a 21 y 28 dpi (**Figura 18A**). Es importante mencionar que los animales WT presentan una carga parasitaria local detectable pero muy cercana al valor 0 UA en los tiempos evaluados. No se observaron diferencias significativas en el número absoluto de leucocitos entre ambos grupos de ratones (**Figura 18 B**). En las imágenes representativas de TAV infectado de ambos grupos de ratones de la **Figura 18 C**, se observa que los animales WT presentan un infiltrado celular focal, mientras que los animales CD73KO presentan un infiltrado de células más difuso. Cabe destacar que, a 60 dpi, se restablece la relación de peso TAV/corporal a valores similares a las condiciones no infectadas correspondientes, al mismo tiempo que la carga parasitaria local disminuye a niveles casi indetectables.

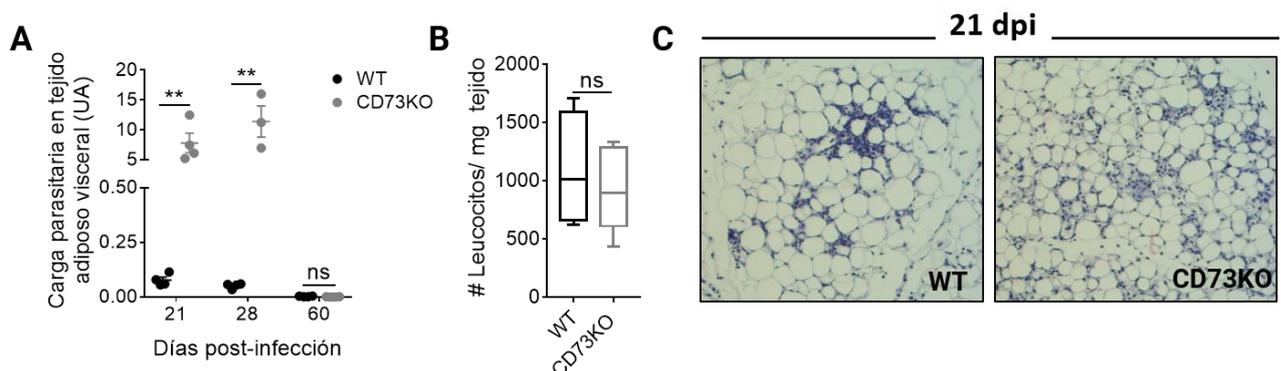


Figura 18. Caracterización de infiltrado leucocitario y carga parasitaria. (A) Evaluación cuantitativa de la cinética de la carga parasitaria en TAV mediante PCR en tiempo real en ratones WT y CD73KO (n = 3-5). Los resultados son la media ± SEM de al menos dos experimentos independientes. (B) Número absoluto de leucocitos con TAV normalizado por miligramo de tejido en animales WT (negro) y CD73KO (gris) a 21 dpi (n = 4-5). (C) Imágenes representativas de TAV teñido con H&E de animales WT y CD73KO a 21 dpi (400X) (** $p < 0.01$; ns: no significativo).

Teniendo en cuenta que los ratones CD73KO poseían una menor carga parasitaria en tejido cardíaco, pero que, sin embargo, presentaban una mayor carga en TAV con respecto a su contraparte WT, se propuso estudiar si presentaban alteraciones en la inmunidad local como consecuencia de la ausencia de actividad de CD73.

Cuando se evaluó la respuesta inmune local no se encontraron diferencias significativas en el número absoluto de macrófagos en TAV de ambos grupos de ratones a 21 dpi (**Figura 19A**). Además, los porcentajes relativos de macrófagos tipo M1 o M2 (**Figura 19B**), así como el porcentaje de macrófagos M1 iNOS + y los niveles locales de NO fueron también similares (**Figura 19C**). Cabe destacar que la frecuencia de los macrófagos tipo M1 fue notablemente menor que la de los macrófagos tipo M2 en el TAV infectado de ambos grupos de ratones. Por otra parte, se observó una disminución en la frecuencia de macrófagos tipo M2 Arg-1+ en VAT CD73KO comparado con su contraparte WT (**Figura 19D**).

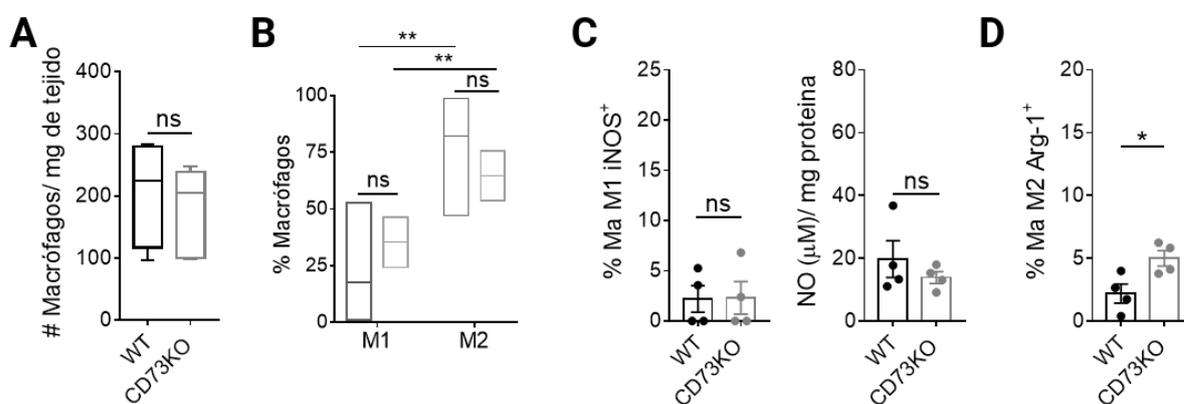


Figura 19. Caracterización de macrófago en TAV de ratones infectados con *T. cruzi* (A) Número absoluto de macrófagos en TAV de ratones WT (negro) y CD73KO (gris) a 21 dpi (n=4-5). (B) Frecuencia relativa de macrófagos (Ma) con fenotipo M1 y M2 en TAV en ratones WT (negro) y CD73KO (gris) a 21 dpi (n=4). Los porcentajes se expresan como la relación entre ambas poblaciones positivas individuales. (C) Frecuencia de Ma M1 iNOS + y cuantificación de óxido nítrico en TAV en ratones WT (negro) y CD73KO (gris) a 21 dpi (n=4). (D) Frecuencia de Ma M2 Arg1 en TAV de ratones WT (negro) y CD73KO (gris) a 21 dpi (n=4). (* $p < 0.05$; ** $p < 0,01$; ns: no significativo).

En cuanto a linfocitos T CD8+ no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células que expresan el marcador de degranulación CD107a (**Figura 20A**), ni productoras de la citoquina pro-inflamatoria IFN- γ (**Figura 20B**). De la misma manera, no se encontraron diferencias en sus respectivas MFI en TAV de ambos grupos de ratones a 21 dpi (**Figura 20 A-B**). En conjunto, nuestros resultados demuestran que la deficiencia enzimática de CD73 no tiene un efecto potenciador de la respuesta inmune en TAV al tiempo evaluado.

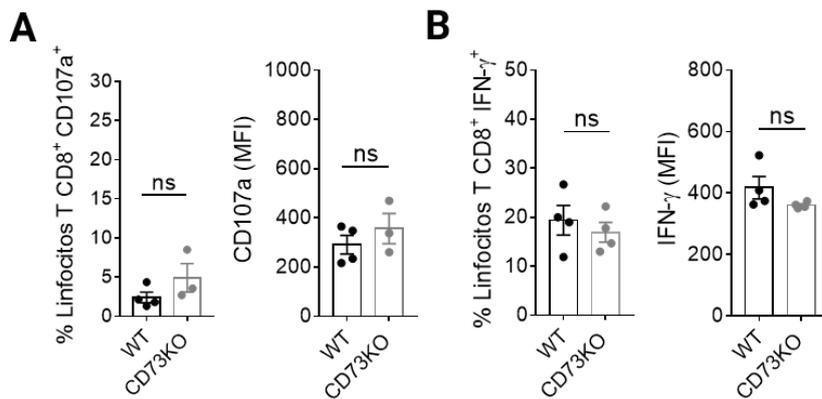


Figura 20. Caracterización de la respuesta de linfocitos T CD8⁺ en TAV. Frecuencia y MFI de linfocitos T CD8⁺ que expresan **(A)** CD107a⁺ (marcador de degranulación) y productores de **(B)** IFN- γ en TAV de ratones WT (negro) y CD73KO (gris) a 21 dpi (n=4) (ns: no significativo).

Influencia de la inhibición de la actividad enzimática de CD73 en la respuesta inmune hepática y la carga parasitaria local

A continuación, se propuso evaluar la influencia de la deficiencia de actividad enzimática de CD73 en el tejido hepático, otro reservorio de parásitos reportado [170]. Como se muestra en la **Figura 21 A y B**, no se observaron diferencias en la proporción de peso de hígado/corporal o en el número absoluto de leucocitos en el tejido hepático infectado a 21 dpi entre ambos grupos de ratones. Con respecto a la posible replicación y persistencia del parásito en el tejido, los animales CD73KO presentaban un incremento significativo en la carga parasitaria de *T. cruzi* en comparación con la contraparte WT a 21 dpi, siendo los niveles similares a los 28 y 60 dpi en ambos grupos de ratones (**Figura 21C**).

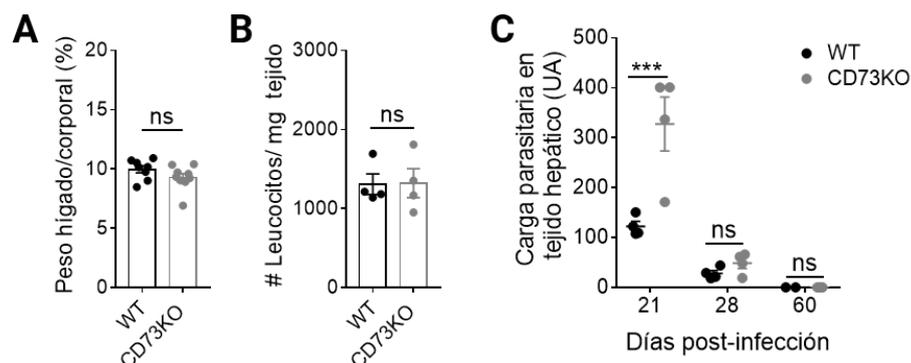


Figura 21. Evaluación de carga parasitaria en tejido hepático. **(A)** Relación peso hígado/ corporal en ratones WT (negro) y CD73KO (gris) a 21 dpi (n= 8-9). **(B)** Número absoluto de leucocitos normalizado por miligramo de tejido en ratones WT (negro) y CD73KO (gris) a 21 dpi (n = 4). **(C)** Análisis cuantitativo de la cinética de la carga parasitaria hepática mediante PCR en tiempo real (n = 3-5). Los resultados se expresan como la media \pm SEM de al menos dos experimentos independientes. (***) $p < 0.001$; ns: no significativo)

Con el objetivo de profundizar en la caracterización de las células inmunes en el tejido se evaluó la respuesta inmune innata de los macrófagos y la respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T CD8+ a 21 dpi, tiempo donde se observaron las diferencias significativas en la carga parasitaria local.

En ese tiempo, el número absoluto de macrófagos se encontraba significativamente aumentado en tejido hepático CD73KO en comparación con el WT (**Figura 22A**). Asimismo, los animales CD73KO presentaban una mayor frecuencia relativa y un mayor número absoluto de macrófagos tipo M1 caracterizados como CD45+ F4/80+ CD86+ CD206- con respecto a los animales WT (**Figura 22B**). Cabe destacar que la subpoblación de macrófagos tipo M1 en el tejido hepático predominaba, abarcando porcentajes desde 78-95% en ambos grupos de ratones, por sobre la subpoblación de macrófagos tipo M2 la cual rondaba 5-22% del total de ambas poblaciones.

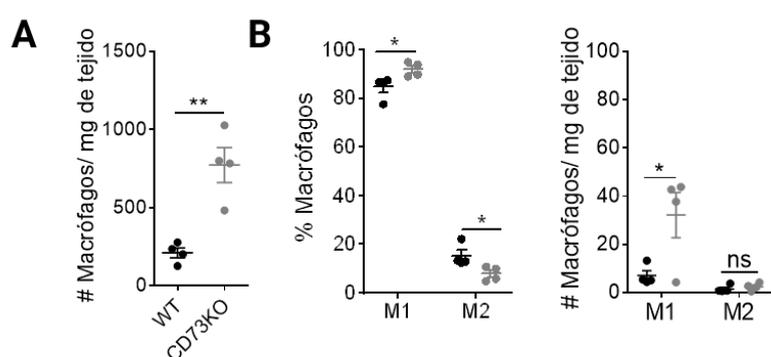


Figura 22. Caracterización de macrófagos en tejido hepático de ratones infectados con *T. cruzi*. (A) Número absoluto de macrófagos (Ma)/mg tejido (n4-5). (B) Porcentaje relativo y número absoluto de Ma/ mg tejido con perfil M1 y M2 en ratones WT (negro) y CD73KO (gris) (n=4) (* $p < 0.05$; ** $p < 0,01$; ns: no significativo).

Posteriormente, se procedió a caracterizar funcionalmente las subpoblaciones de macrófagos en el tejido hepático. La frecuencia de macrófagos tipo M1 que expresaban la enzima iNOS, así como la expresión de iNOS/célula y los niveles de NO se redujeron significativamente en el hígado deficiente en CD73 en comparación con el WT, como se muestra en la **Figura 23 A**. En contraste, no se encontraron diferencias en la frecuencia de macrófagos hepáticos tipo M1 productores de la citoquina IL-12 (**Figura 23B**), como tampoco en macrófagos tipo M2 que expresan Arg-1 o productores de IL-10 en el hígado CD73KO en comparación con el hígado WT (**Figura 23C**).

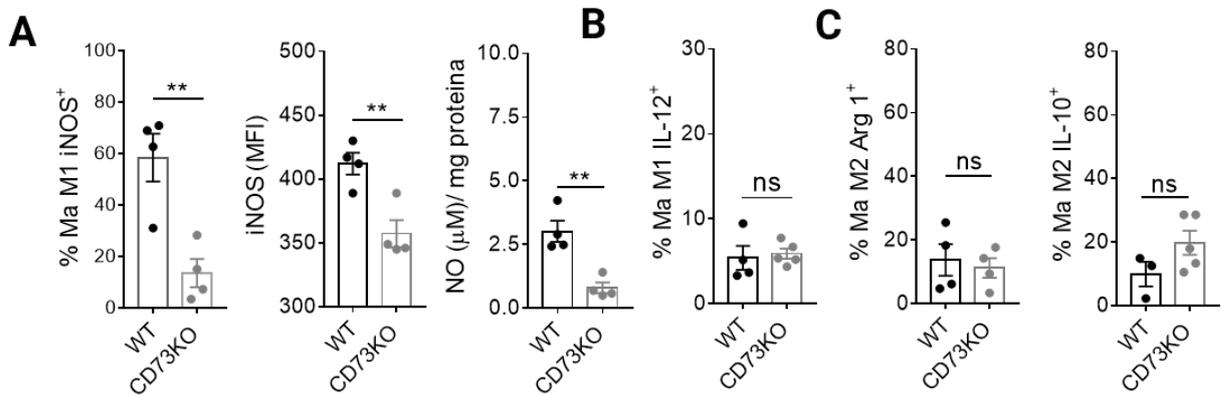


Figura 23. Características funcionales de macrófagos en tejido hepático de ratones infectados con *T. cruzi*. (A) Frecuencia e intensidad de fluorescencia media (MFI) de Ma M1 iNOS⁺ (n=4). Niveles de NO hepático (n=4). (B) Frecuencia de Ma M1 IL-12⁺ (n=4-5). (C) Frecuencia de Ma M2 Arg-1⁺ o IL-10⁺ (n=4-5). Comparación en tejido hepático de animales WT (negro) y CD73KO (gris) a 21 dpi (** $p < 0,01$; ns: no significativo).

Los datos demuestran que la manipulación de CD73 aumenta los macrófagos tipo M1 en hígado, pero es insuficiente para generar una respuesta microbicida eficaz contra *T. cruzi*.

A continuación, se analizó la respuesta inmune de las células T CD8, responsables del control del patógeno mediante la producción de citoquinas, potenciación de la activación de células de la inmunidad innata y de ejercer citotoxicidad en las células infectadas. Como se observa en la **Figura 24 A y B**, no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de las células T CD8⁺ totales, así como en las células T CD8⁺ que expresan el marcador de degranulación CD107a ó que producen IFN- γ en el tejido hepático entre ambos grupos de ratones a 21 dpi. A su vez, la expresión de CD107a e IFN- γ por célula presentaba valores similares entre ambos grupos evaluados (datos no mostrados).

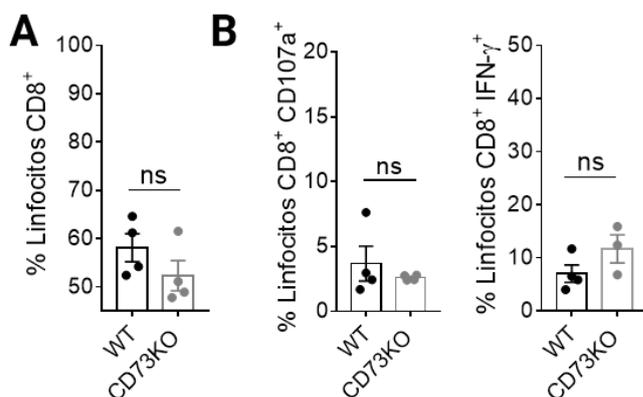


Figura 24. Evaluación la respuesta de linfocitos T CD8⁺ en tejido hepático infectado con *T. cruzi*. (A) Frecuencia de linfocitos T CD8⁺ y (B) linfocitos T CD8⁺ que expresan CD107a y productores de IFN- γ en tejido hepático de ratones WT (negro) y CD73KO (gris) a 21 dpi (n = 4). (ns: no significativo)

Teniendo en cuenta que el daño tisular provocado por la inflamación en la infección aguda con el parásito es uno de los factores que determina la susceptibilidad a la patología, se decidió evaluar comparativamente el daño hepático en ambos grupos de ratones. En concordancia con el incremento en la carga parasitaria tisular a los 21 dpi, los ratones CD73KO presentaron un aumento del daño hepático medido por los niveles plasmáticos de ALT y AST en comparación con los ratones WT (**Figura 25**).

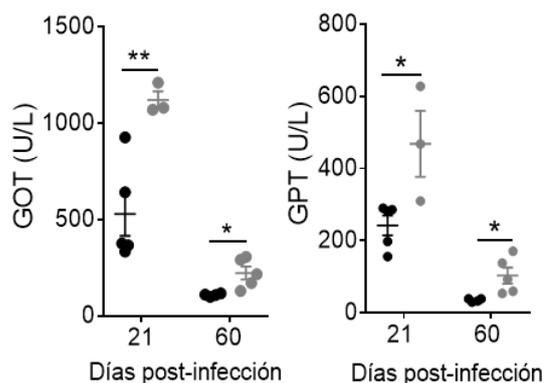


Figura 25. Determinación de marcadores bioquímicos de daño hepático. Niveles plasmáticos de aspartato aminotransferasa (GOT) y alanina aminotransaminasa (GPT) en ratones WT y CD73KO a 21 y 60 dpi (n = 4-5). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns: no significativo).

A su vez, observamos que los ratones deficientes en la enzima CD73 del sistema purinérgico presentaron un incremento en los marcadores de lesión hepática también a 60 dpi cuando la carga parasitaria local ya se encontraba controlada. En conjunto, estos datos sugieren que, la deficiencia enzimática de CD73 es insuficiente para establecer una respuesta microbiana efectiva temprana necesaria para mantener la infección bajo control en el hígado, a pesar de que la infección logra desviar la polarización de los macrófagos hacia un perfil fenotípico tipo M1.



03

CAPÍTULO

RESULTADOS I PARTE B

Niveles extracelulares de ATP y ADO en diferentes tejidos diana de la infección y efecto de la actividad de CD73 en el balance del microambiente purinérgico local.

Determinación de los niveles extracelulares de ATP/ADO en los tejidos post-infección

Para profundizar en la evaluación de la relación entre la deficiencia en CD73 y la regulación de la respuesta inmune gatillada por la presencia del parásito en cada tejido blanco de la infección, se propuso como objetivo “*Determinar los niveles extracelulares de los metabolitos purinérgicos que se generan en los diferentes tejidos diana durante la infección murina, analizando el efecto de la actividad de CD73 en el balance local de la liberación de ATP y ADO*”. Para llevar a cabo este objetivo, los diferentes tejidos blanco de animales infectados se incubaron en PBS estéril en una relación de peso/volumen predeterminada durante 1 hora a 37° C y posteriormente, los niveles de ATP y ADO extracelulares se cuantificaron mediante un ensayo de bioluminiscencia y por HPLC, respectivamente.

Los corazones CD73KO presentaron niveles significativamente mayores de ATP extracelular y menores de ADO en comparación con los corazones WT a 7 dpi (**Figura 26 A y B**), siendo este órgano blanco el único que exhibía diferencias significativas en los niveles de ATP entre ambos grupos experimentales en comparación con TAV e hígado. Además, no se observaron diferencias significativas en los niveles de ATP y ADO liberados por los hígados infectados de ambos grupos de ratones. En contraste, el TAV CD73KO presentaba una cantidad significativamente menor de ADO, mientras que no se observaron diferencias significativas en los niveles de ATP en comparación con el TAV WT a 7 dpi (**Figura 26 A y B**).

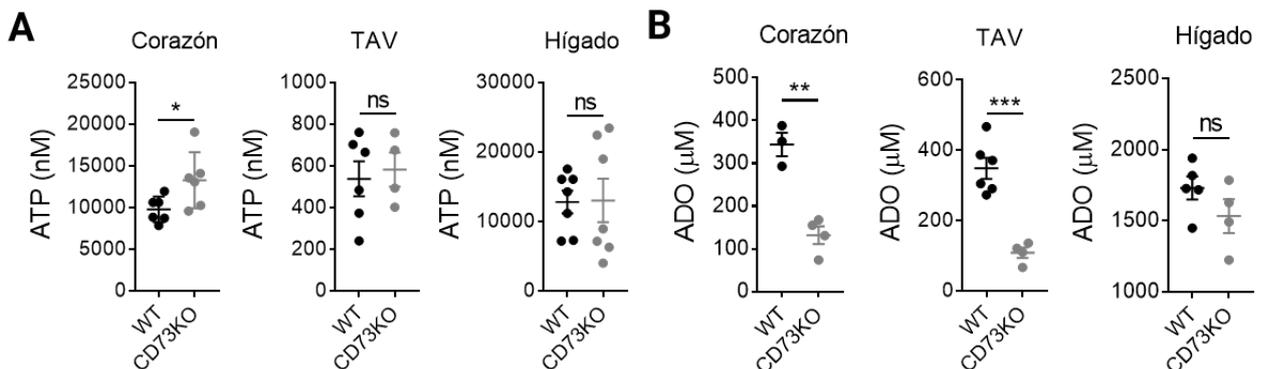


Figura 26. Cuantificación de ATP y ADO extracelulares en los tejidos blanco de *T. cruzi*. Niveles extracelulares de (A) ATP (n = 6-7) y (B) ADO (n = 4-6) en sobrenadantes de tejido cardíaco, tejido adiposo visceral (TAV) y tejido hepático de ratones WT (negro) y CD73KO (gris) a 7 dpi. Los resultados se expresan como media \pm SEM y representan tres experimentos independientes. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: no significativo).

Al analizar la relación entre ambos metabolitos purinérgicos en cada tejido blanco, se observó que los tejidos deficientes en CD73 exhibieron una relación ATP/ADO significativamente más alta que los órganos contraparte WT. Además, al comparar la relación ATP/ADO en distintos tejidos observamos que en el tejido cardíaco los valores eran significativamente mayores, lo que confirma que la actividad de CD73 tiene un efecto predominante en tejido cardíaco infectado en relación a los otros tejidos analizados (**Figura 27**). Además, en animales CD73KO la proporción de ATP/ADO cardíaco fue 4,8 y 2,7 veces mayor que la del hígado y TAV, respectivamente.

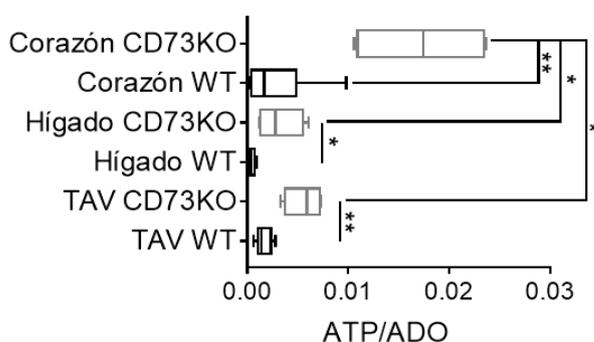


Figura 27. Evaluación de microambiente purinérgico según relación ATP/ADO. Se calculó la relación ATP / ADO en sobrenadantes de tejido cardíaco, TAV y tejido hepático de ratones WT (negro) y CD73KO (gris) a 7 dpi. La concentración de los analitos purinérgicos fue determinada por kit luminiscente y HPLC, respectivamente (* $p < 0.05$; ** $p < 0,01$).

En resumen, estos resultados demuestran que la deficiencia de la actividad enzimática de CD73 genera un impacto mayor exclusivamente a nivel de tejido cardíaco, el cual exhibe un neto desvío del microambiente purinérgico hacia el metabolito pro-inflamatorio/microbicida ATP, en detrimento de los niveles de ADO, el metabolito anti-inflamatorio que sufre una fuerte disminución.

Seguidamente, se evaluó si los cambios en el microambiente purinérgico observados en tiempos tempranos de infección se prolongaban hasta 21 dpi, teniendo en cuenta que es el tiempo al cual se observaban las mayores diferencias en los respectivos parasitismos tisulares. Se observó que el microambiente purinérgico permanece desviado hacia mayores niveles de ATP en los tres tejidos CD73KO mientras que los niveles de ADO sólo se encontraron significativamente disminuidos en tejido cardíaco CD73KO comparado con el de los animales WT (**Figura 28 A-B**).

En contraste, los niveles de ADO en el tejido hepático se encontraban incrementados en los animales deficientes en la enzima CD73 comparado con los animales WT, mientras que en el TAV los niveles de ADO eran indetectables en ambos grupos experimentales (**Figura 28B**). Cabe destacar que los valores no detectables de ADO en TAV pueden deberse a que este tejido se encuentra significativamente reducido a 21 dpi (**Figura 17A**).

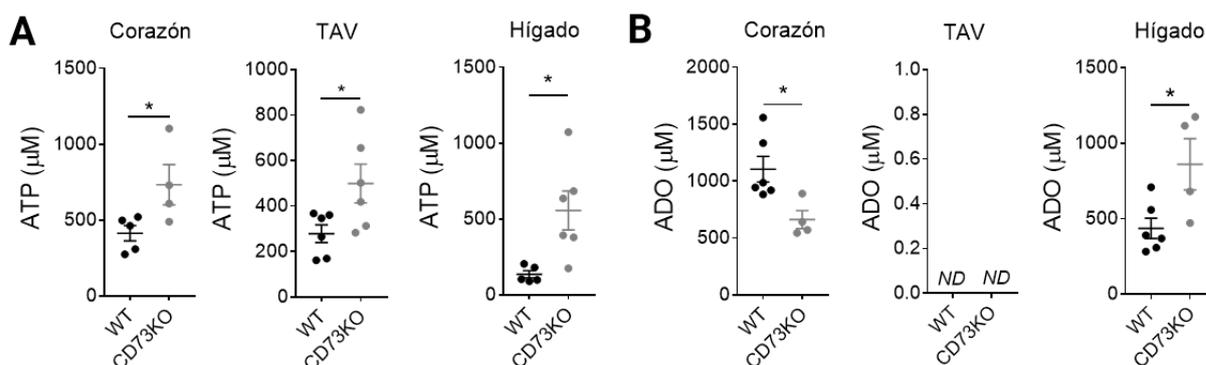


Figura 28. Cuantificación de ATP y ADO extracelulares en los tejidos blanco de *T. cruzi*. Niveles extracelulares de **(A)** ATP y **(B)** ADO en sobrenadantes de tejido cardíaco, tejido adiposo visceral (TAV) y tejido hepático WT (negro) y CD73KO (gris) a 21 dpi (n= 4-6). Los resultados se expresan como media \pm SEM y representan dos experimentos independientes. (* $p < 0.05$; ND: non-detectable).

En conjunto, estos resultados sugieren que los corazones CD73KO exhiben una relación ATP/ADO claramente desviada hacia un medio purinérgico pro-inflamatorio con mayores niveles de ATP y menores niveles de ADO.

Análisis de las fuentes celulares de la enzima CD73 en los tejidos blanco de infección

Posteriormente se determinó la fuente celular de la ectoenzima CD73 en cada tejido evaluado. Para lograr este objetivo, se estudió la expresión de la ectoenzima CD73 en células inmunes y parenquimales a través un ensayo de inmunofluorescencia a 7 dpi, determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI) por célula. Para la cuantificación se realizó una proyección en Z de numerosas imágenes confocales en 10 campos al azar y se cuantificó el valor gris medio mediante el uso del software Image J.

El estudio demostró que las células parenquimales de los tejidos evaluados; cardiomiocitos, adipocitos y hepatocitos, expresaron una cantidad relativamente baja de la ectoenzima CD73 en contraste con la fuerte expresión que presentaron las células inmunes presentes en dichos tejidos (**Figura 29**).

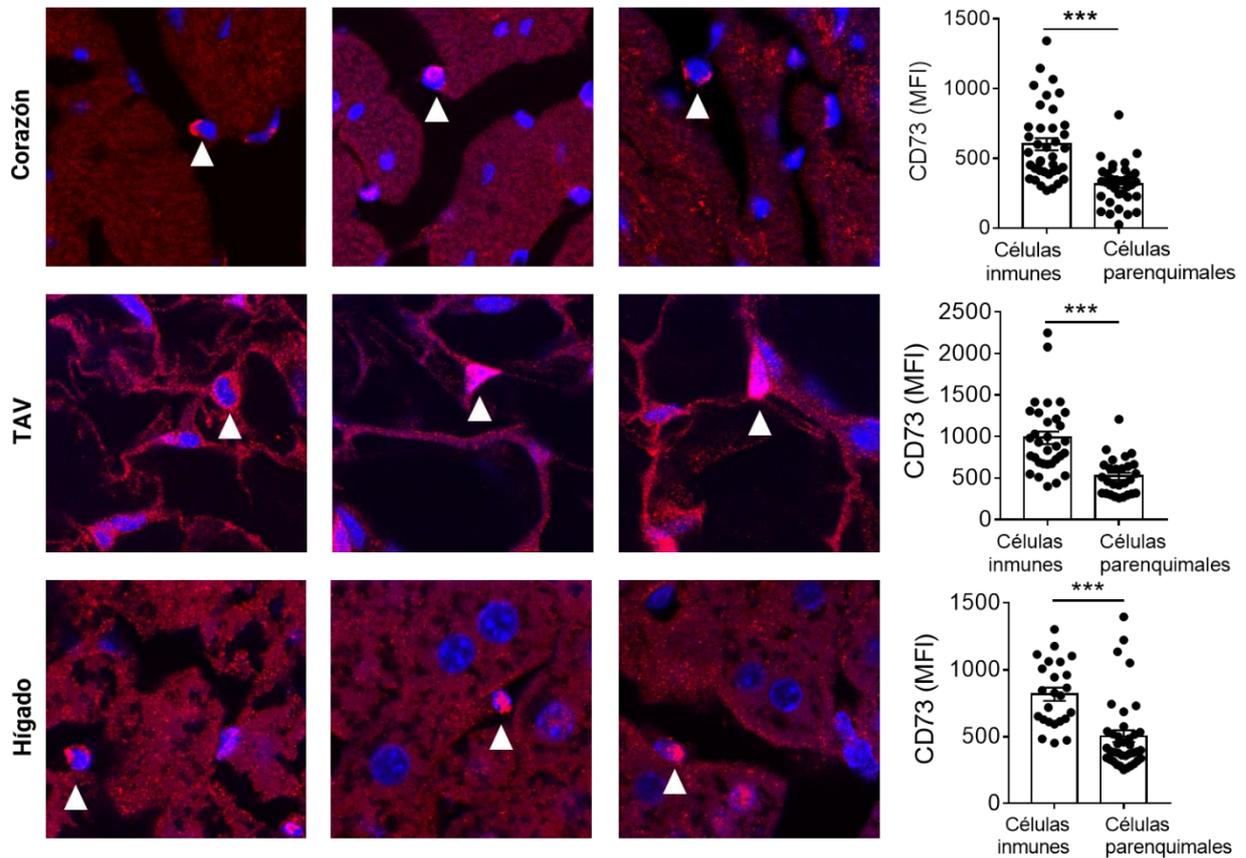


Figura 29. Expresión de CD73 en células inmunes y parenquimales de los tejidos blanco de *T. cruzi*. Imágenes confocales representativas de la expresión de CD73 en tejido cardíaco, TAV y tejido hepático a 7 dpi. Las puntas de flecha blancas indican células inmunes. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se cuantificó utilizando el software Image J haciendo una proyección en Z de 10 imágenes de campos al azar obtenidas con el microscopio confocal Olympus FLUOVIEW FV1200 (ampliación original 60x más zoom digital 4x) y analizando el valor gris medio de las ROI luego de la sustracción de la fluorescencia dada por el anticuerpo secundario y por la autofluorescencia del tejido.

Seguidamente se evaluó la expresión de las ectoenzimas CD39 y CD73 en diferentes subpoblaciones de leucocitos en los tejidos WT infectados a 21 dpi mediante análisis de citometría de flujo (**Figura 30**). Como se muestra en la **Figura. 30 A**, se evaluaron dentro de los leucocitos totales (CD45+), los macrófagos (F4/80+), neutrófilos (Ly6G+), linfocitos T CD4 (CD3+ CD4+), linfocitos T CD8 (CD3+ CD8+) y linfocitos B (CD19+).

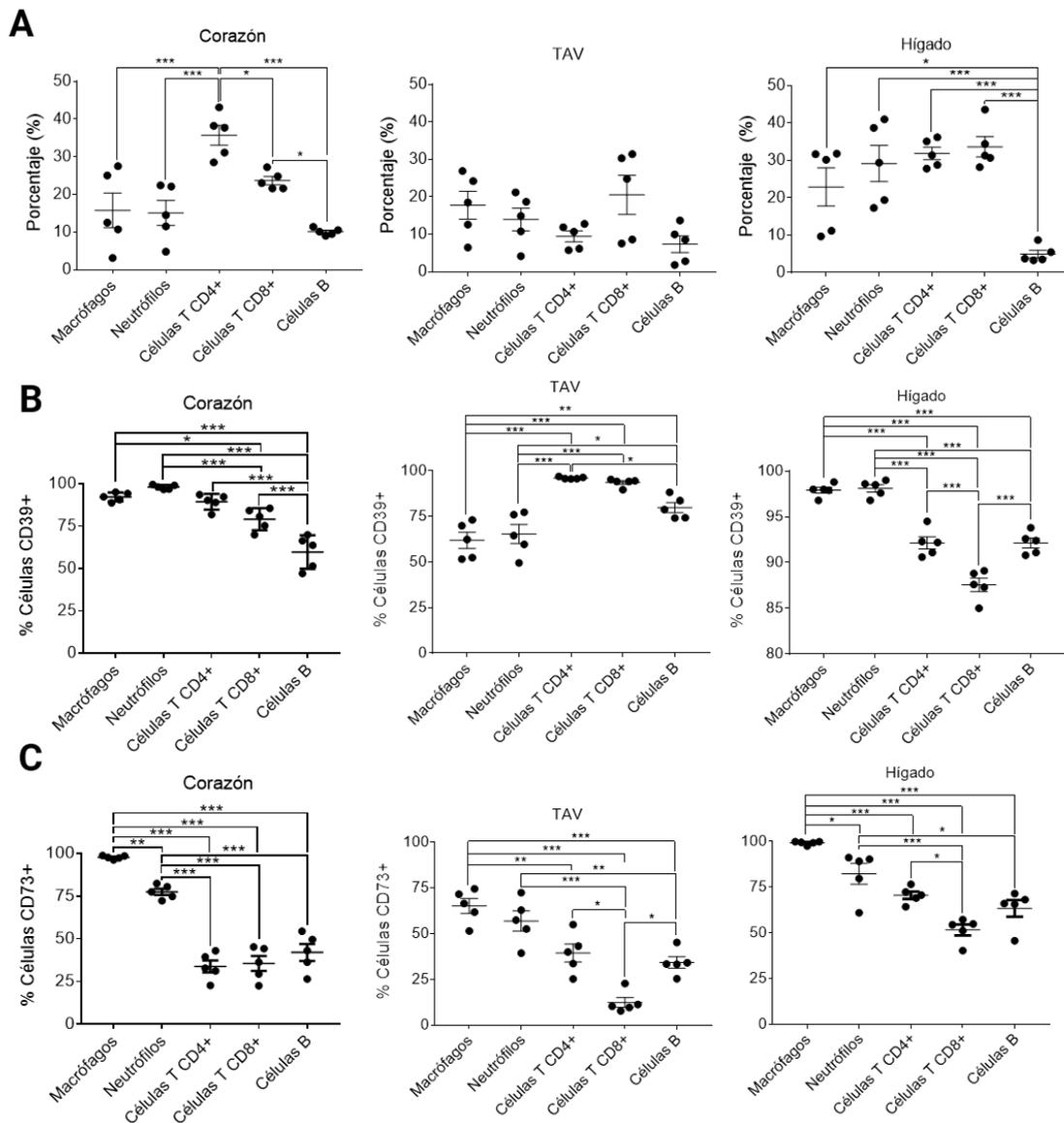


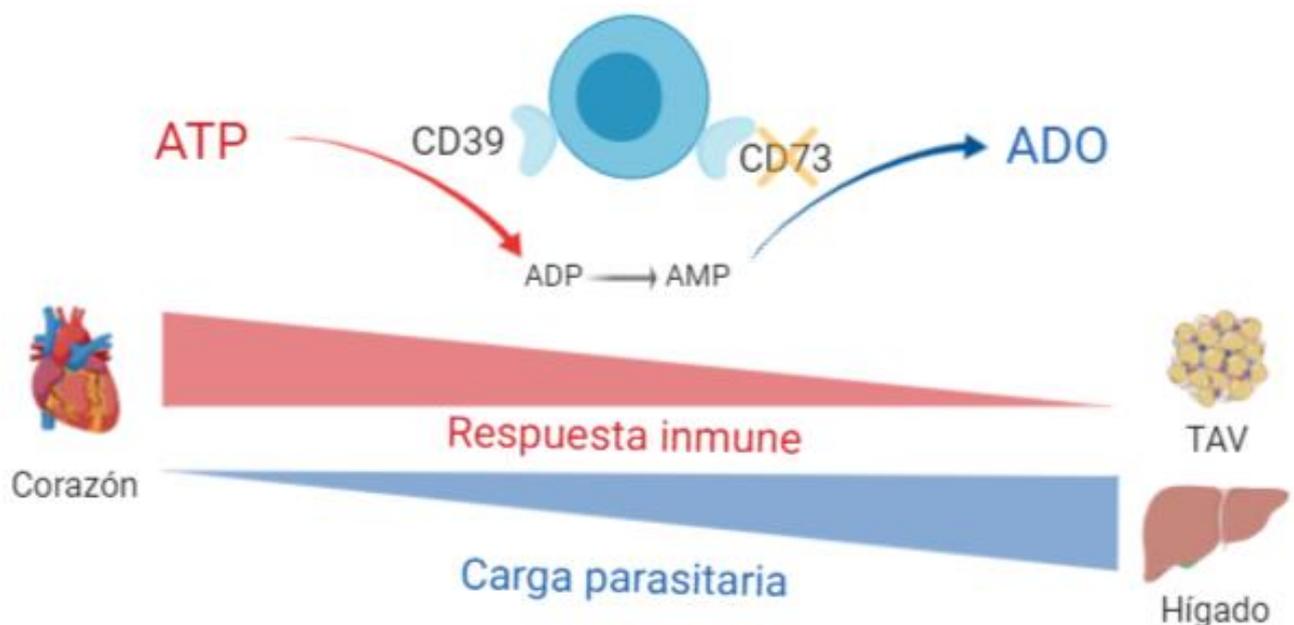
Figura 30. Expresión de enzimas purinérgicas en células inmunes en los tejidos blanco de *T. cruzi*. (A) Frecuencia de macrófagos, neutrófilos, linfocito T CD4+, linfocitos T CD8+ y células B en corazón, TAV e hígado de ratones WT a 21 dpi. Porcentaje de subpoblaciones de células (B) CD39+ y (C) CD73+ en corazón, TAV e hígado de ratones WT a 21 dpi (n = 5). Los leucocitos fueron previamente seleccionados con el marcador panleucocitario CD45. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0,001$).

En los corazones infectados a los 21 dpi, la población celular predominante eran los linfocitos T CD4 cooperadores seguidos de los linfocitos T CD8, células mieloides que comprenden los macrófagos y los neutrófilos y, por último, los linfocitos B.

No hubo diferencias significativas entre las frecuencias de las subpoblaciones analizadas de los leucocitos en el TAV, mientras que, en el hígado, sólo el porcentaje de células B fue significativamente inferior al porcentaje de todas las demás subpoblaciones de células inmunes evaluadas. Con respecto a corazón e hígado, los macrófagos y los neutrófilos fueron las principales poblaciones de leucocitos que expresaba ambas enzimas CD39 y CD73 (**Figura 30 B y C**). La ectoenzima CD73 se expresó en alrededor del 100% de los macrófagos en los tejidos cardíacos y hepáticos, seguido de los neutrófilos y en menor medida en las subpoblaciones de linfocitos T y B. Mientras que, en el TAV, la expresión de CD73 se observó en el 55-65% de células mieloides y en tanto, que el compartimento de células linfoides no superaba el 50% de expresión. La ectoenzima CD39 se expresó mayoritariamente en las células mieloides comparada con las células de origen linfoide en tejido cardíaco y hepático, mientras, que en TAV, se observó un mayor porcentaje de las células T, seguidas de las células B que expresan CD39 con respecto a ambas subpoblaciones de células mieloides evaluadas. Estos resultados sugieren que el microambiente purinérgico único generado en cada uno de los tejidos depende del efecto combinado de ambas ectoenzimas purinérgicas expresadas tanto en las células inmunes como así también en las células parenquimales. Sin embargo, se necesitan realizar más estudios para establecer la participación de cada subpoblación celular en lo efectos globales observados en este trabajo de Tesis.

Conclusiones parciales de Resultados I

- La inhibición de CD73 genera una respuesta inmune eficaz anti-*T. cruzi* en el tejido cardiaco.
- El TAV deficiente en la actividad de esta enzima presenta un entorno favorable para el desarrollo intra-tisular del parásito, lo que lo convierte en un importante reservorio que podría ser responsable del incremento en la parasitemia de los ratones CD73KO.
- La ectoenzima CD73 modula de manera diferencial el microambiente de ATP/ADO en cada tejido diana de infección.
- El balance de metabolitos purinérgicos sería el responsable de modular la respuesta anti-*T. cruzi* de forma dependiente del tejido.
- Las células inmunes dentro de los tejidos infectados expresan altos niveles de ectoenzima CD73.





CAPÍTULO

RESULTADOS II

Rol del sistema purinérgico en la miocarditis de pacientes con enfermedad de Chagas crónica terminal

Habiendo observado el impacto determinante que tiene el sistema purinérgico a nivel de tejido cardíaco en la población de células inmunes en el marco de la infección por *T. cruzi*, se planteó "*Estudiar la correlación que existe entre el sistema purinérgico y el desarrollo de miocarditis en tejido cardíaco de pacientes con enfermedad de Chagas crónica terminal*". Para lograr este Objetivo Específico se establecieron colaboraciones con el *Hospital Nuestra Señora de la Misericordia* (Córdoba) y con el Dr. Carlos Vigliano, Jefe de Servicio Anatomía Patológica del *Hospital Universitario Fundación Favaloro* (Buenos Aires). Mediante una colaboración se obtuvo acceso a muestras de suero de pacientes seropositivos infectados crónicamente y asintomáticos, donantes controles y muestras de biopsias post-transplante de corazones de pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica en estadio terminal. Se obtuvo la firma del consentimiento informado de los pacientes antes de incluirlos al estudio y la aprobación de los protocolos por parte de los Comités de Ética de sendas instituciones participantes, como se detalla en la sección de materiales y métodos del presente trabajo de Tesis.

Determinación de los niveles plasmáticos de eATP en los pacientes crónicos seropositivos

En primera instancia, para evaluar la modulación de la respuesta inflamatoria mediada por el sistema purinérgico se decidió analizar los niveles de ATP extracelular (eATP) en plasma de pacientes con enfermedad de Chagas crónica en fase indeterminada. Esta etapa se caracteriza por presentar serología positiva en ausencia de manifestaciones clínicas cardíacas, digestivas y de sistema nervioso. Se observó que los pacientes seropositivos presentaban niveles significativamente incrementados de ATP extracelular en comparación con los donantes control (**Figura 31**). Estos resultados se encuentran en concordancia con un reporte previo de nuestro grupo de trabajo donde evidenciamos que las enzimas metabólicas de ATP, CD39 y CD73 se encontraban significativamente disminuidas en los linfocitos T circulantes de pacientes seropositivos comparado con los donantes control [160].

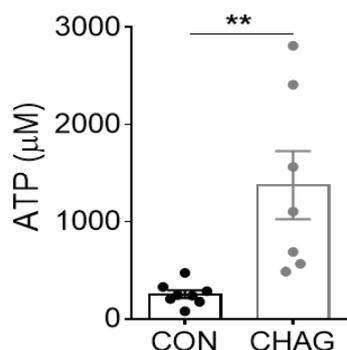


Figura 31. Los pacientes seropositivos presentan mayores niveles de eATP en plasma. Concentración de ATP en plasma de pacientes seropositivos (CHAG) y donantes control (CON) (n=7) (** $p < 0,01$).

Análisis clínico de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica con cardiomiopatía

A continuación, se evaluó la presencia de componentes inmunoregulatorios de la vía purinérgica de CD73 en poblaciones de células inmunes infiltrantes de miocardio de pacientes con cardiomiopatía de Chagas crónica (CCC) en la fase terminal. Para ello, se analizaron dieciocho explantes de tejido cardíaco de pacientes sometidos a trasplante cardíaco ortotópico en el Hospital Universitario Fundación Favaloro. Los datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio y de las biopsias utilizadas en el estudio se encuentran resumidos en la **Tabla I**.

Tabla I	Pacientes CCC	
Edad (mediana)	51 (39- 68)	<u>Valor de referencia:</u> Peso del corazón adulto~ 300 g
Género		
Femenino	n= 5	
Masculino	n=13	
Índice de masa corporal (kg/m ²)	22 (18,40 -28,93)	<u>ECOCARDIOGRAMA:</u>
Explantes cardíacos		<u>FEVI:</u> fracción de eyección del ventrículo izquierdo (%) Valor de referencia:> 50%
Peso de corazón (g)	465 (335- 590)	
Peso corazón/ peso corporal (g/kg)	7,2 (4,2 - 9,1)	
Clasificación de Kuschnir	Grupo III	<u>DDVI:</u> diámetro diastólico del ventrículo izquierdo (mm) Valor de referencia: Hombre: 50,0 ± 4,0; Mujer: 46,0 ± 4,0.
Ecocardiograma		
FEVI (%)	18 (10-33)	
DDVI (mm)	72 (61- 77)	
Clasificación de capacidad funcional cardíaca NYHA	III - IV	

Los pacientes presentaban una mediana de edad de 51 años (rango de 39- 68 años de edad). La cohorte tenía un 72,2% de pacientes hombres (n=13) y un 27,8% de pacientes mujeres (n=5). El índice de masa corporal (IMC) se encontraba en los valores normales, sólo una paciente presentaba valores menores a 18,5 por lo que presentaba bajo peso. El promedio de pesos de los corazones explantados fue de 465 gramos (rango de 335 a 590 gramos), el cual se encontraba incrementado con respecto al peso normal de un corazón adulto (varía según edad y sexo, para adultos es entre 250-300 g en mujeres y 300-350 g en hombres).

La evaluación clínica de los pacientes mediante ecocardiogramas reveló que todos los pacientes evaluados presentaban una pérdida en la función cardíaca observada como disminución en el porcentaje de fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI). Dichos pacientes presentaban una mediana de FEVI= 18% cuando el valor de referencia para la población con funciones cardíacas normales es superior al 50%. Asimismo, los pacientes evaluados evidenciaban un incremento en el diámetro diastólico del ventrículo izquierdo (DDVI), con una mediana de DDVI: 72 mm cuando los valores de referencia para mujeres y hombres son de 46 y 50 mm, respectivamente. En su conjunto, estos hallazgos clínicos demuestran una disfunción ventricular izquierda significativa con una insuficiencia cardíaca moderada a grave, grado III según la NYHA (*New York Heart Association*) donde los pacientes presentan marcadas limitaciones en las actividades físicas y los síntomas de insuficiencia cardíaca y síndrome de angina pueden presentarse en reposo.

Estudio del infiltrado celular de los explantes de tejido cardíaco de pacientes con cardiopatía de Chagas crónica

Para el estudio de los explantes de tejido cardíaco, los corazones se fijaron y se embebieron en parafina y la zona del tabique interventricular de cada uno de ellos fue seleccionada para el análisis de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica (IHQ). En primer lugar, se estudiaron los infiltrados de células mononucleares inflamatorias mediante la tinción de CD68 para macrófagos y CD3 para linfocitos T por IHQ. Como se observa en la **Figura 32 B**, en cada paciente se cuantificaron las células CD68+ y CD3+ en 10 campos elegidos al azar y representativos de cada sección histológica. En las imágenes representativas de cortes de tejido cardíaco de dos pacientes (protocolo 44186 y protocolo

60180) se pueden observar células con tinción positiva para CD68 (**Figuras 32 A**). La mediana del número de células CD68+ en los pacientes con CCC fue de 3,25 células CD68+/ campo con un rango que va desde 0,7-26,3 células CD68+/campo. La mayoría de los pacientes (77,7%) poseía valores de números absolutos de macrófagos/campo por debajo del promedio total 5,8 células CD68+/campo (**Figura 32 C**).

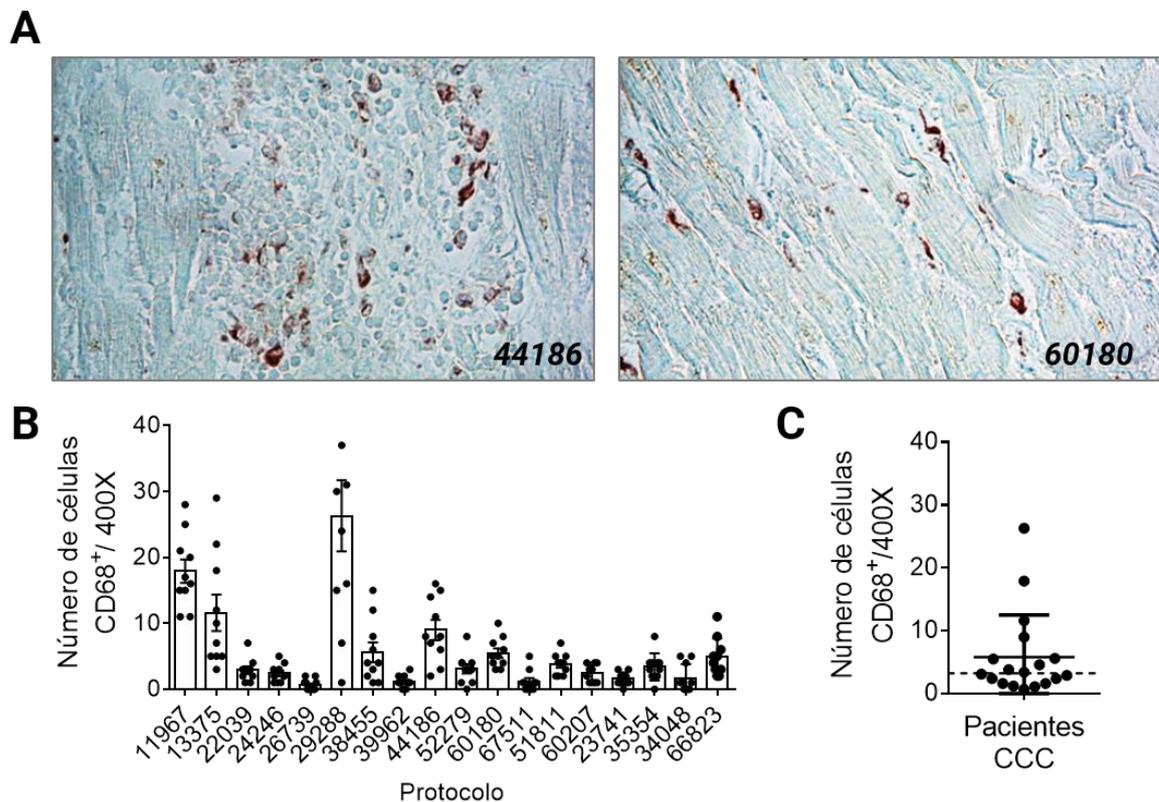


Figura 32. Cuantificación de macrófagos en tejido cardíaco de pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica avanzada. (A) Imágenes representativas (protocolos 44186 y 60180) de inmunohistoquímica de CD68+ para cuantificar macrófagos en pacientes CCC (400X). **(B)** Cuantificación de células CD68+ en 10 campos al azar representativos de cada sección histológica de 18 pacientes con sus respectivos protocolos. **(C)** Promedio de cuantificación de células CD68+ por paciente (n=18).

Como se detalla en la **Figura 33 B**, se cuantificó individualmente en cada paciente los linfocitos T (CD3+) en 10 campos elegidos al azar y representativos de cada sección histológica. En las imágenes representativas de la **Figura 33 A** se puede observar la tinción de CD3 por IHQ de los linfocitos T infiltrantes en el tejido cardíaco de dos pacientes (protocolo 29288 y protocolo 11967). La mediana del número de células CD3+ fue de 14,2 células CD3+/ campo con un rango que abarca desde 0,8 - 54,6 células CD3+/campo. La mayoría de los explantes (55,5%) poseía valores de números absolutos de linfocitos T/campo por debajo del promedio total 19,84 células CD3+/campo, mientras que número absoluto de linfocitos T/campo poseía una mayor dispersión, como puede observarse en el gráfico de la **Figura 33 C**.

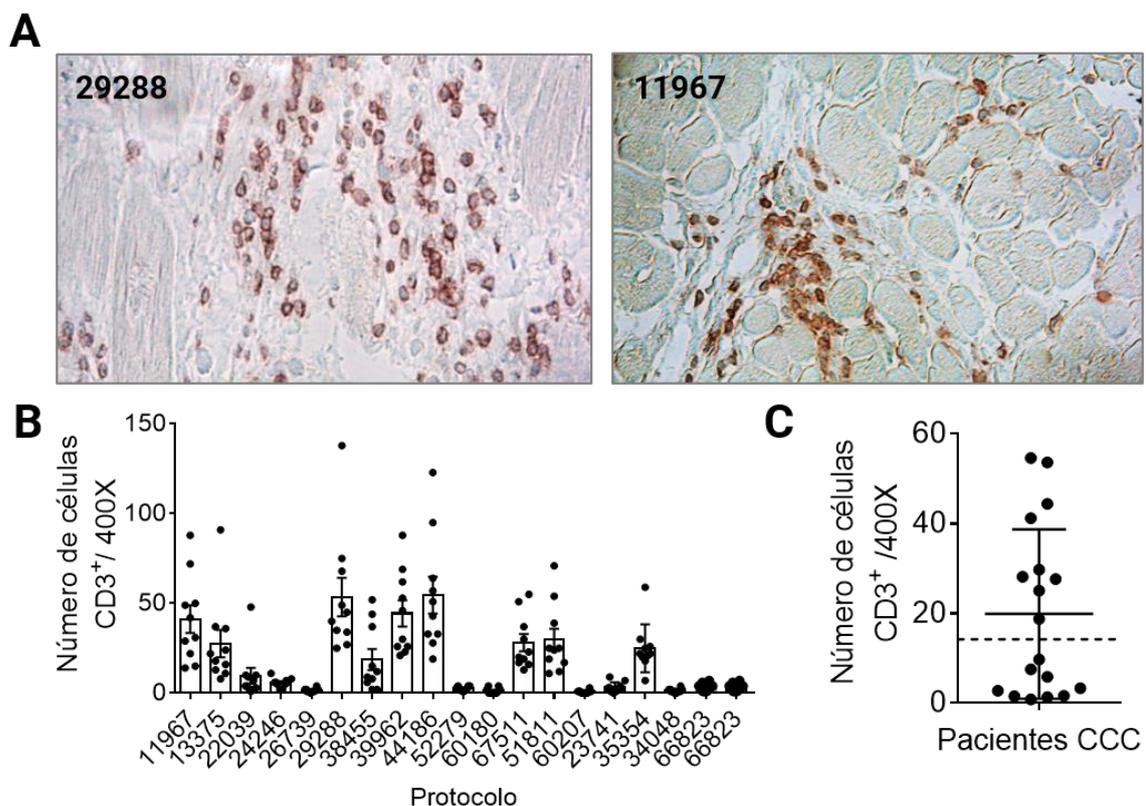


Figura 33. Cuantificación linfocitos en tejido cardíaco de pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica avanzada. (A) Imágenes representativas (protocolos 29288 y 11967) de inmunohistoquímica de CD3+ para cuantificar linfocitos en pacientes CCC (400X). (B) Cuantificación de células CD3+ en 10 campos al azar representativos de cada sección histológica de 18 pacientes con sus respectivos protocolos. (C) Promedio de cuantificación de células CD3+ por paciente (n=18).

Determinación del grado de miocarditis de los explantes de tejido cardíaco de pacientes chagásicos trasplantados

Con el objetivo de determinar el grado de miocarditis en los explantes de tejido cardíaco se utilizaron los criterios reportados anteriormente por el Dr. Carlos Vigliano y otros [109, 171]. Según la clasificación adoptada, se consideró: 1) miocarditis severa cuando el promedio de la suma del número de linfocitos T (CD3+) y macrófagos (CD68+) era superior a la mediana, 2) miocarditis moderada cuando el promedio de la suma de linfocitos T y macrófagos se encontraba entre el percentil 25 y la mediana; y 3) miocarditis leve cuando el promedio de la suma linfocitos T y macrófagos se encontraba por debajo del percentil 25. Como se puede observar en la **Figura 34**, para esta cohorte de pacientes se obtuvo una mediana de 18,45 células/ campo y un percentil 25 de 5,57 células/ campo.

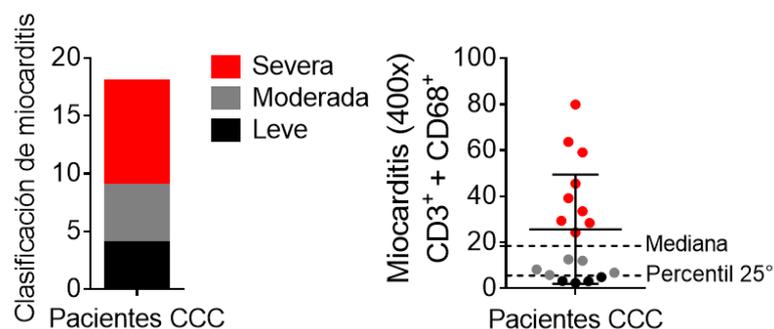


Figura 34. Clasificación de miocarditis en pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica avanzada. La miocarditis de los pacientes CCC (n=18) fue clasificada según si la sumatoria de células CD68+ + células CD3+ era mayor que la mediana: miocarditis severa (rojo) n=9; mayor que el percentil 25 pero menor a la mediana: miocarditis moderada (gris); n=5 ó menor que el percentil 25: miocarditis leve (negro); n=4.

Considerando los valores de mediana y percentilo 25 obtenidos, se pudieron clasificar las muestras de la siguiente manera: nueve pacientes presentaban miocarditis severa (rojo), cinco pacientes presentaban miocarditis moderada (gris) y cuatro pacientes presentaban miocarditis leve (negro).

Al agrupar los explantes de tejido cardíaco clasificados según el grado de miocarditis, se puede observar que los linfocitos T eran la subpoblación prevalente entre las células mononucleares en comparación con los macrófagos en el grupo de pacientes con miocarditis severa, mientras que no hubo diferencias entre ambas subpoblaciones de células mononucleares en los tejidos cardíacos de los pacientes con miocarditis leve y moderada (**Figura 35**).

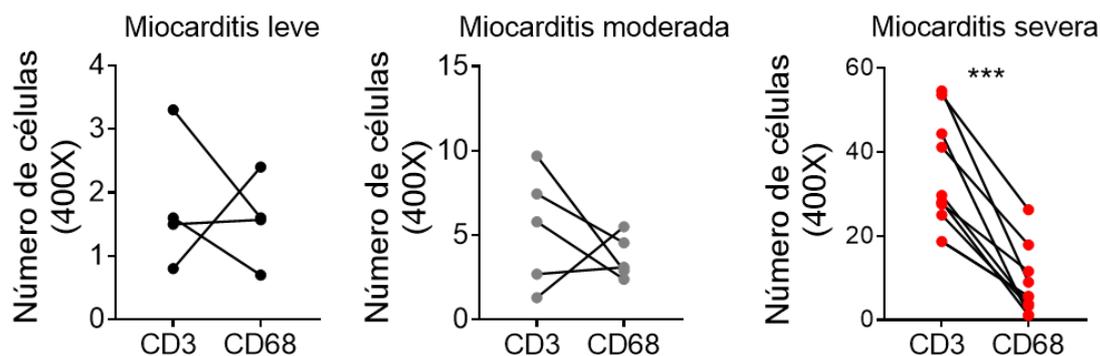


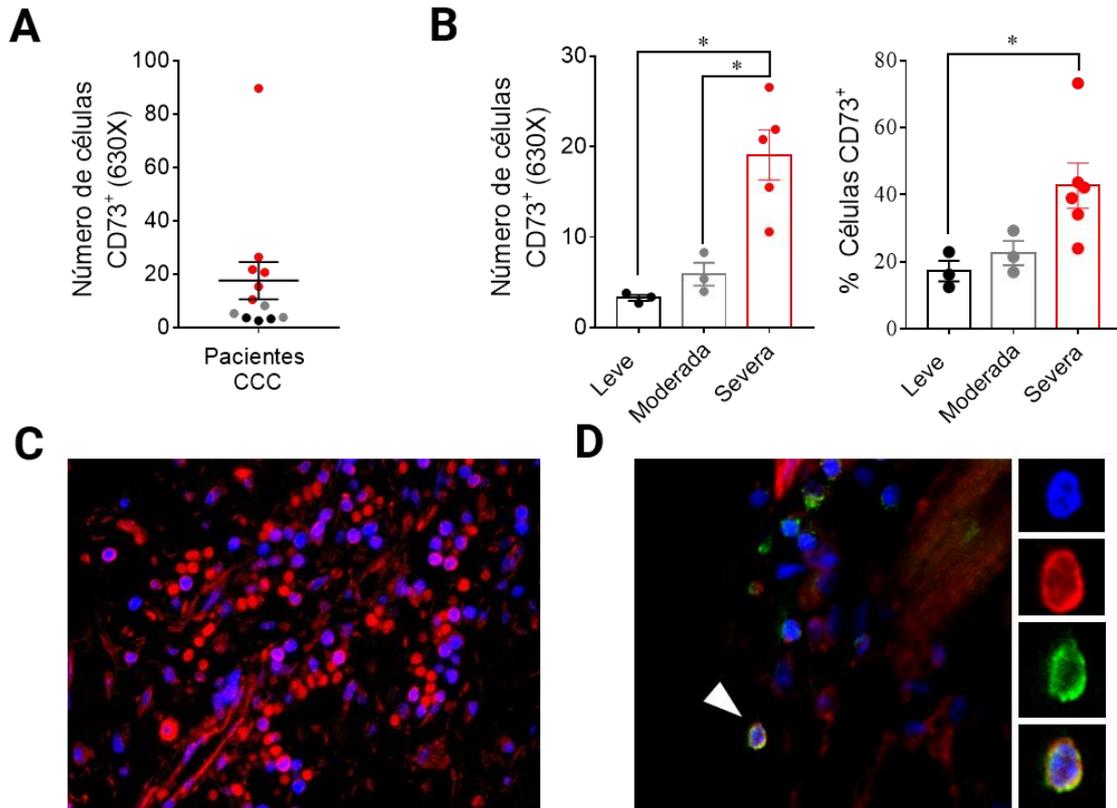
Figura 35. Agrupación de pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica según el grado de miocarditis. Número de macrófagos y linfocitos T en los 3 grupos de pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica avanzada. Los pacientes están representados por color según la clasificación de miocarditis: severa (rojo) n=9, moderada (gris) n=5 y leve (negro) n=4 (***) $p < 0,001$.

Determinación la expresión de CD73 en los explantes de pacientes según el grado de miocarditis

Teniendo en cuenta que CD73 incrementa en presencia de mediadores pro-inflamatorios como TNF e IL-1 β [144, 145] y en respuesta a hipoxia con el objetivo de frenar el excesivo daño colateral a la sobre-activación de células inmunes en el tejido inflamado [136], se consideró interesante evaluar la expresión de la enzima CD73 en el tejido cardíaco de los pacientes con cardiomiopatía chagásica en estado terminal.

Para ello, se determinó la expresión de la enzima CD73 por inmunofluorescencia en cortes de tejido cardíaco (**Figura 36 A**). Como se muestra en la **Figura 36 B**, se observó que el número de células CD73+/campo estaba significativamente incrementado en los pacientes con miocarditis severa con respecto a los pacientes con miocarditis moderada y leve. De la misma forma, la frecuencia de células CD73+ fue significativamente mayor en los pacientes

con miocarditis severa con respecto a los pacientes con miocarditis leve. En la imagen representativa de la **Figura 36 C**, se puede observar una alta expresión de la enzima CD73 en las células inmunes en un explante de tejido cardíaco de un paciente con miocarditis severa (protocolo 29288); dicho paciente presentaba un promedio de 89,8 células CD73+/campo.



mismas células (flecha blanca), por lo que se corroboró que los linfocitos T expresan la enzima CD73 en el tejido cardíaco de dichos pacientes.

Cabe destacar que otras subpoblaciones inmunes también pueden ser positivas para CD73, ya que fue posible observar células CD73+ que no coexpresan el marcador CD3. Estos resultados nos indican que las muestras de corazón de pacientes con cardiomiopatía de Chagas crónica en etapa terminal poseen un infiltrado inflamatorio con la presencia preponderante de células mononucleares (células T y macrófagos) que en los explantes de tejido cardíaco con miocarditis severa prevalecen los linfocitos T, subpoblación que expresa la enzima CD73.

Determinación de la expresión de HIF-1 α en los explantes de tejido cardíaco según el grado de miocarditis

Considerando que estudios recientes indican que tanto citoquinas pro-inflamatorias como agentes infecciosos regulan a nivel transcripcional al factor HIF 1- α , y que éste, a su vez modula los niveles de expresión de ambas enzimas purinérgicas CD39 y CD73, se evaluó la expresión de HIF-1 α (**Figura 37 A**).

Los explantes con miocarditis severa presentaron un número significativamente mayor de células HIF-1 α + en comparación con los explantes cardíacos de pacientes con miocarditis leve (**Figura 37 B**). Como se puede observar en las imágenes representativas de la **Figura 37 C y D**, la expresión de HIF-1 α (rojo) en tejido cardíaco de pacientes con miocarditis severa se presenta tanto en el citoplasma (flechas amarillas) de las células como en sus núcleos (flechas blancas).

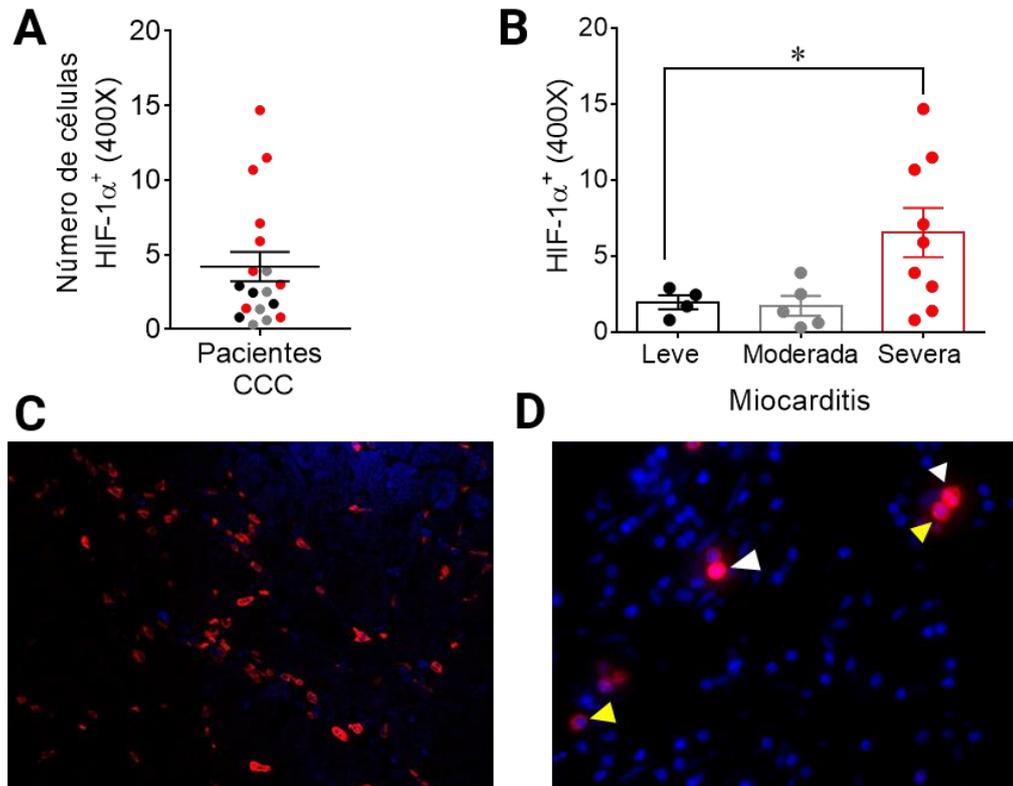


Figura 37. Evaluación de expresión de HIF-1α según el grado de miocarditis. (A) Cuantificación del número de células HIF-1α+ en 10 campos al azar representativos de cada sección histológica de 18 pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica avanzada. (B) Número de células CD73+ en los distintos grupos de pacientes clasificados según grado de miocarditis. (C y D) Imágenes de inmunofluorescencia representativa de la expresión de HIF-1α (rojo) y tinción nuclear (Hoescht, azul) en paciente con miocarditis severa (protocolo 44186 y 29288) (* $p < 0,05$).

Determinación de la relación entre el grado de miocarditis y la expresión de HIF-1α y de CD73

A continuación, se estudió la existencia o no de correlación entre el número de células que expresaban HIF-1α y las que expresaban la enzima purinérgica (CD73) y si existía relación con el grado de miocarditis observado. Como se detalla en la **Figura 38**, se demostró la existencia de una fuerte correlación positiva entre el número de células HIF-1α+/campo y el número de células CD73+/campo (**Figura 38 A**). Además, se observó que tanto el número de células HIF-1α+/campo como el número de células CD73+/campo se correlacionaban positivamente con el grado de miocarditis (**Figura 38 B**).

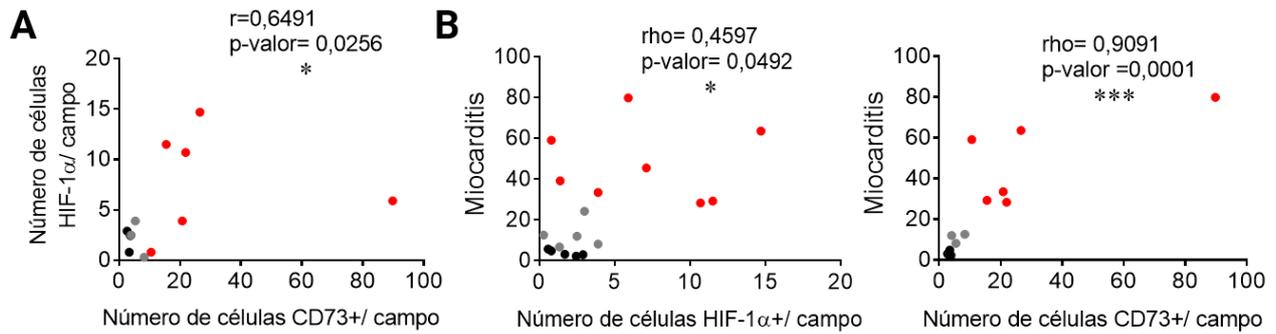


Figura 38. Correlación entre el número de células HIF-1α+ / CD73+ y la miocarditis. (A) Correlación entre el número de células HIF-1 α+ /campo y número de células CD73+/campo. **(B)** Correlación entre el grado de miocarditis y el número de células HIF-1 α+ /campo y CD73+ /campo. Los pacientes están representados por color según la clasificación de miocarditis: severa (rojo), moderada (gris) y leve (negro). *Correlación de Spearman* (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Determinación de la relación entre la carga parasitaria y la expresión de HIF-1α y de CD73

Posteriormente, se evaluó la existencia de correlación de la carga parasitaria de los explantes de tejido cardíaco con los parámetros de miocarditis y número de células CD73+ y HIF-1α+ previamente obtenidos. Los datos de la carga parasitaria semicuantitativa obtenidos para *kDNA* (ADN kinetoplastídico) por PCR convencional, fueron provistos por el Dr. Carlos Vigliano [67]. De manera interesante, se observó que la carga parasitaria de *T. cruzi* presentaba una fuerte correlación positiva tanto con el grado de miocarditis, como con el número de células HIF-1α+/campo y con el número de células CD73+ /campo (**Figura 39**).

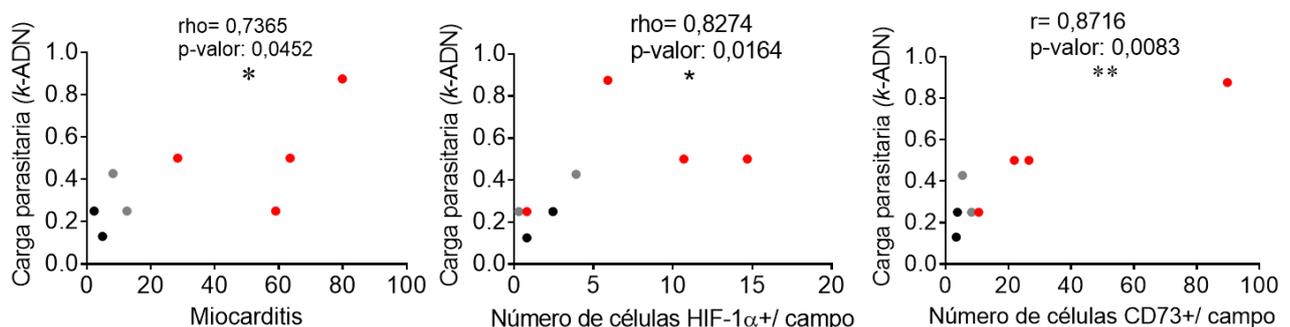
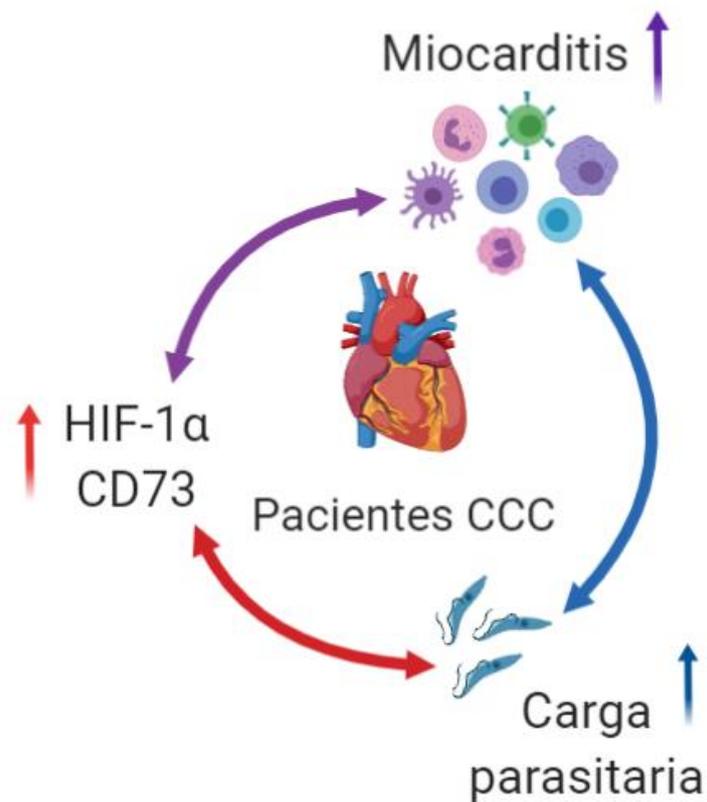


Figura 39. Determinación de la correlación entre la carga parasitaria de los tejidos cardíacos de pacientes CCC con la expresión de HIF-1α / CD73 y la miocarditis. Correlación de la carga parasitaria con el grado de miocarditis; el número de células HIF-1 α+ / campo y el número de células CD73+ /campo. Los pacientes están representados por color según la clasificación de miocarditis: severa (rojo), moderada (gris) y leve (negro). *Correlación de Spearman* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Estos resultados claramente sugieren que la expresión de la enzima CD73 en células inmunes infiltrantes se correlaciona con un mayor grado de miocarditis y una incrementada presencia parasitaria en el tejido miocárdico de pacientes en la etapa terminal de la cardiomiopatía. Considerando que la persistencia del parásito es clave para los eventos inflamatorios que participan en el desencadenamiento y mantenimiento de la miocarditis, sería posible proponer que la importante expresión de HIF-1 α y su gen blanco CD73, favorecerían la generación de ADO fomentando un microambiente purinérgico que vuelve a las células inmunes incapaces de ejecutar mecanismos microbicidas favoreciendo de esta manera la persistencia del parásito.

Conclusiones parciales de Resultados II

- Los explantes de tejido cardíaco presentan un infiltrado de células mononucleares con predominio de macrófagos y linfocitos T.
- Los linfocitos T son una población de células mononucleares muy abundante en la miocarditis severa.
- El grado de miocarditis presenta una correlación positiva con la expresión de HIF-1 α y de CD73 en células infiltrantes.
- La carga parasitaria local se correlaciona fuertemente con el grado de expresión de HIF-1 α y CD73 en células mononucleares.



05

CAPÍTULO

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Caracterización del rol de adenosina en la respuesta inmune cardíaca a la infección por *Trypanosoma cruzi* y efecto de su manipulación en la progresión de la miocardiopatía chagásica.

Discusión

Numerosos trabajos y revisiones publicados a lo largo de la última década han adjudicado al sistema purinérgico un rol clave en la modulación de la respuesta inmune [120, 122, 140, 172, 173], y dependiendo de las células inmunes y de los microorganismos involucrados, varios reportes también postulan a este sistema en un rol protector o deletéreo en la resistencia del huésped a diferentes agentes patógenos [174-180]. Actualmente, CD73 es blanco de numerosos anticuerpos inhibidores (anti-CD73) que se utilizan en pruebas clínicas para la inmunoterapia del cáncer [131] y como un objetivo terapéutico en los trastornos cardiovasculares [148, 181, 182]. Sin embargo, esta ectoenzima tiene muchas funciones fisiológicas protectoras que deben tenerse en cuenta para el desarrollo de nuevas terapias. Su participación en el contexto de una infección cardíaca, como lo es la cardiomiopatía de Chagas crónica ha sido poco investigada. En la presente Tesis Doctoral estudiamos el rol del sistema purinérgico en la modulación de la respuesta inmune aguda frente a la infección por *T. cruzi* y evaluamos su posible participación en la persistencia del parásito y progresión a la cardiomiopatía chagásica crónica. En conjunto, nuestros resultados demuestran que la deficiencia de ADO por inhibición de la actividad enzimática de CD73 mejora la respuesta inmune temprana contra la infección por *T. cruzi* en el miocardio. Sin embargo, también se destaca el hecho de que la deficiencia de la actividad de CD73 modula la respuesta anti-*T. cruzi* de manera dependiente del tejido infectado. Ya que, en contraste con lo hallado en miocardio, en otros tejidos diana como TAV e hígado, la inhibición de CD73 genera un microambiente propicio para el desarrollo del parásito.

Recientemente, nuestro grupo ha reportado que la inhibición farmacológica transitoria de la actividad enzimática de CD73 tempranamente luego de la infección por *T. cruzi* disminuye significativamente la carga parasitaria cardíaca, aumenta la frecuencia de los macrófagos tipo M1 e incrementa la producción local de citoquinas y metabolitos microbicidas en un modelo experimental utilizando ratones de la cepa BALB/C. Con respecto a la respuesta inmune adaptativa, la inhibición de esta ectoenzima disminuye la frecuencia de las células T CD4 productoras de IL-10 [158]. La respuesta inmune montada localmente previene la progresión de la miocardiopatía crónica, lo que sugiere que la actividad de CD73 modula la respuesta inmune cardíaca anti-*T. cruzi*. Notablemente, después de un corto período de tiempo, el microambiente pro-inflamatorio y microbicida vira hacia un microambiente anti-

inflamatorio que probablemente respalde la cicatrización del daño miocárdico producido por la infección e inflamación. A los fines de profundizar en los resultados reportados para este trabajo de Tesis Doctoral se propuso el estudio de la participación de ADO generada por acción de CD73 en el contexto de la infección con *T. cruzi*. Hipotetizamos que la deficiencia de esta ectoenzima generaría una fuerte respuesta inmune anti-*T. cruzi* haciendo al organismo resistente al desarrollo del parásito.

Para llevar a cabo este trabajo utilizamos un modelo experimental empleando ratones de la cepa C57BL/6 que presentan una modificación génica que anula la actividad enzimática de CD73. En línea con las observaciones previas del grupo, en estos ratones genéticamente deficientes en CD73 observamos una incrementada respuesta inflamatoria y microbicida en el miocardio asociada con una reducción significativa en la carga parasitaria cardíaca. Estos hallazgos están en línea con estudios previos que revelaron que la producción de ADO catalizada por CD39 y CD73 inhibe la activación vía TCR y las funciones efectoras de las células T CD8 activadas [183-185] y representa un activo mecanismo de inmunosupresión de las células T regulatorias [166]. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles del marcador bioquímico específico de daño cardíaco en ambos grupos de ratones, lo que sugiere que la carga parasitaria cardíaca incrementada en ratones controles y el microambiente inflamatorio potenciado observado en los ratones CD73KO resultan en un daño miocárdico comparable. Estos hallazgos sugieren que la inhibición de la actividad de CD73 debería representar una ventaja para mantener la infección aguda bajo control.

Sorprendentemente, la parasitemia en ratones CD73KO se encontraba significativamente incrementada comparado con los ratones WT, lo que podría estar indicando la existencia de un nicho favorable para el crecimiento de parásitos fuera del tejido cardíaco. Teniendo en cuenta que se ha reportado que el tejido adiposo visceral es un importante nicho reservorio del parásito *T. cruzi* [186, 187], evaluamos la respuesta inmune y la carga parasitaria en el TAV. Basalmente los ratones CD73KO exhibieron una incrementada relación peso TAV/corporal y menores cantidades de ADO extracelular en relación a los ratones WT. Estos hallazgos concuerdan con publicaciones previas que demuestran que la delección genética del receptor ADORA1, el receptor de ADO predominante en el tejido adiposo blanco, está asociada con un incremento en la masa del tejido graso y es independiente de la cepa del

ratón [188, 189]. Además, se ha reportado que la inactivación de la ectoenzima CD73 promueve la formación de placa aterosclerótica [190] y aumenta los niveles de lípidos intramiocelulares [191].

Luego de la infección, el tejido adiposo presenta un influjo de macrófagos generalizado que se acompaña de una mayor expresión de enzimas lipolíticas (lipasa sensible a hormonas - HSL- y lipoproteína lipasa -LPL-), lo que conduce a una reducción de la masa de grasa [186]. Esta reducción es también sustentada por mediadores inflamatorios liberados localmente por las células inmunes. Las citoquinas inflamatorias, particularmente el TNF, exhiben una potente actividad lipolítica [192], al aumentar la expresión de enzimas lipolíticas [193] y al disminuir la expresión de numerosos genes implicados en la prevención de la lipólisis [194-196]. En este sentido, encontramos que el perfil de macrófagos pro-inflamatorio tipo M1 predominó sobre los macrófagos tipo M2 durante la fase aguda dentro del TAV de ambos grupos de ratones. Por el contrario, durante la fase crónica de la infección por *T. cruzi*, los macrófagos con fenotipo M2 predominan sobre los macrófagos con fenotipo M1 en este tejido [197]. Por otro lado, también se ha reportado que los tripomastigotes de *T. cruzi* ingresan a los preadipocitos y adipocitos a través de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLr), entre otros [198]. Por lo tanto, es posible pensar que la replicación de parásitos junto con el microambiente pro-inflamatorio establecido localmente podría promover la reducción de la masa del tejido adiposo observada tempranamente luego de la infección; pero luego, durante la fase crónica de la infección, la disminución del infiltrado inflamatorio, el restablecimiento del perfil anti-inflamatorio de macrófagos tipo M2 y la disminución de la carga parasitaria ayuda a restaurar el peso del TAV a los valores observados basalmente.

En contraste con la fuerte respuesta inmune establecida en el miocardio de los ratones CD73KO infectados, en el TAV la respuesta de macrófagos no difiere entre los ratones infectados de ambas cepas. Sin embargo, la mayor frecuencia de macrófagos tipo M2 que expresan Arg-1 observados en este tejido podría estar promoviendo el crecimiento intracelular del parásito en el tejido deficiente en CD73, ya que la expresión de Arg-1 está relacionada con el crecimiento del intracelular de *T. cruzi* [199]. Además, las ectonucleotidasas de origen parasitario podrían estar hidrolizando el ATP que se encuentra

en niveles incrementados en el TAV de los ratones CD73KO lo que promovería el crecimiento de parásitos proporcionando una ventaja en su crecimiento comparado con los parásitos alojados en el tejido adiposo de animales controles. En este sentido, varios estudios reportan que la presencia de ectoenzimas metabolizadoras de ATP en microbios podría modular la interacción huésped-patógeno al influir positivamente en la replicación intracelular [200].

De manera similar a la respuesta inmune del tejido adiposo, en el hígado de animales deficientes en CD73 los indicadores de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa estudiados no presenta ventajas funcionales en relación a su contraparte control. Contrario a lo esperado, la producción de NO por parte de los macrófagos tipo M1 y la concentración de NO en el lisado de tejido hepático se encuentra disminuido en los ratones deficientes en la ectoenzima CD73. Estos hallazgos pueden deberse a que, entre todos los tejidos, el hígado tiene una de las actividades más altas de ATPasas y ADPasas [201] por lo que la inhibición de la ectoenzima CD73 no sería suficiente para poder modular localmente de manera eficiente la respuesta inmune montada frente a *T. cruzi*. Se ha reportado que la enzima CD73 se expresa en tejidos hepatobiliopancreáticos en condiciones normales e incluso aumenta su expresión en pacientes con afecciones crónicas como neoplasias hepáticas [202, 203], postulándose como posible blanco terapéutico en diferentes neoplasias [204, 205]. Consecuentemente, los ratones CD73KO presentan una carga parasitaria local incrementada comparado con su contraparte WT. En resumen, la hiperplasia observada basalmente en el tejido adiposo asociada a una ineficiente potenciación de la respuesta inmune mediada por el sistema purinérgico en el TAV e hígado del grupo experimental deficiente en la enzima CD73 probablemente ofrece ventajas para el desarrollo del parásito en estos tejidos debido al microambiente más permisivo. Sin embargo, aún queda por investigar si otros mecanismos inmunes no analizados en este trabajo, podrían estar favoreciendo la replicación de parásitos en el contexto de la deficiencia de CD73 dentro de estos tejidos diana de la infección.

La liberación de nucleótidos de adenina al medio extracelular representa un primer paso crítico para el inicio de la señalización purinérgica. Una vez liberados, su vida media en el medio extracelular está determinada por la actividad de las enzimas metabólicas de ATP [142, 206], y los efectos finales sobre la respuesta inmune innata y adaptativa dependen del

equilibrio entre ATP y ADO en el microambiente tisular [124, 167]. Con respecto a la influencia de las enzimas metabólicas de ATP en tejido cardíaco, recientemente se describió que los ratones CD73KO exhiben una función cardíaca deteriorada post-isquemia/reperfusión ya que la actividad de CD73 es determinante para el proceso de reparación cardíaca después del infarto de miocardio. El mecanismo subyacente implica un aumento profundo en la hidrólisis de ATP / NAD y AMP, que resulta principalmente de la actividad CD73, pero es independiente de la actividad de la enzima CD39 [207].

En el presente estudio, descubrimos que, si bien la cantidad de ATP liberada a los 7 dpi por los corazones con deficiencia de CD73 fue significativamente mayor que su contraparte WT, la cantidad de ATP liberada por el TAV y el hígado no presentó diferencias significativas entre ambos grupos de ratones. Este hecho puede deberse probablemente a que las células cardíacas tienen una mayor capacidad para producir ATP que otras células parenquimales como consecuencia de su función fisiológica de contracción. En particular, la relación ATP/ADO de corazones CD73KO infectados fue significativamente mayor que su contraparte en los animales WT, pero también mayor que la de los otros tejidos CD73KO estudiados, por lo que se puede concluir que la mayor desviación del microambiente purinérgico extracelular hacia ATP debido a la inhibición de la actividad enzimática de CD73 se da a nivel cardíaco. Asimismo, el hígado, así como el TAV, de los ratones CD73KO exhibieron una mayor relación ATP/ADO en comparación con los tejidos correspondientes en la contraparte WT. Las diferencias observadas en la respuesta inmune local pueden deberse, al menos en parte, a la expresión diferencial de enzimas purinérgicas que conducen a un microambiente purinérgico extracelular único en cada tejido. Sin embargo, se ha reportado que las células que arriban a los tejidos y las células residentes deben adaptarse metabólicamente a su microambiente y desarrollar firmas transcripcionales que reflejen la adaptación a la función dentro de ese tejido, por lo que no se puede descartar por completo un ajuste metabólico como característica de la adaptación celular al nicho donde se encuentran [208].

Al evaluar la expresión de CD73 en los diferentes tejidos diana de la infección, se observó que los cardiomiocitos presentan menor expresión de la ectoenzima CD73, siendo las células inmunes las que primordialmente la expresan localmente. Mientras que un trabajo previo de Bonner y colaboradores reportaron la falta de CD73 en células cardíacas de ratón en

estado basal [133], otros estudios realizados en modelos murinos [141, 209], así como los datos del Atlas de Proteoma Humano, informan una expresión leve a moderada de la proteína CD73 en este tejido bajo condiciones basales, que incrementa en caso de isquemia/reperfusión [210]. La razón de esta discrepancia podría ser la manipulación del tejido durante la digestión mecánica y procesamiento que provocó la disminución en la expresión de CD73 en la superficie de las células no inmunes en el tejido cardíaco. Además, se ha demostrado la tinción positiva de CD73 en células endoteliales coronarias, este hallazgo se correlaciona con el hecho de que ATP y ADO producen una potente vasodilatación de los vasos coronarios [211].

En el tejido hepático se detectó una mayor expresión de CD73 en el infiltrado inflamatorio comparado con las células parenquimales. Estos resultados están de acuerdo con los estudios que informan que la expresión de ectoenzimas del sistema purinérgico está regulada por aumento en hipoxia, inflamación y tumores en el tejido hepático [203, 212] y con los datos de expresión leve a moderada para esta ectoenzima en tejido hepático normal reportados en el Atlas del Proteoma Humano [210].

En el TAV se observó una expresión relativamente baja en los adipocitos comparado con una mayor expresión de CD73 en las células que los rodean que se corresponden a las células del estroma vascular y al infiltrado inmune. Resultados similares en tejido adiposo humano se han descrito previamente [213], mientras que los datos del Atlas de Proteoma Humano reportan expresión nula de CD73 en el tejido adiposo humano [210]. Sin embargo, sería necesario confirmar fehacientemente la contribución de las células inmunes vs. células parenquimales en la modulación de la respuesta inmune mediante el estudio de animales quimeras que presenten deficiencia de la actividad enzimática de CD73 en sólo un compartimento celular.

En conjunto, en base a los resultados obtenidos se puede pensar que el microambiente purinérgico único generado en cada tejido analizado depende del efecto combinatorio de las ectoenzimas expresadas en las células inmunes, pero, en parte también, en las células parenquimales de cada tejido. Nuestros resultados demuestran claramente que la deficiencia de ADO producida por acción de CD73 tiene un mayor impacto selectivamente en la respuesta inmune local del huésped en el tejido cardíaco sobre otros tejidos infectados

evaluados. La mayor disponibilidad de ATP pro-inflamatorio combinado con niveles más bajos de ADO dentro del miocardio deficiente en la actividad CD73 podría estar determinando la eficiencia de la respuesta anti-*T. cruzi* observada en este tejido diana clínicamente relevante.

Nuestro desafío para abordar la segunda parte de este Tesis Doctoral es poder transformar estos avances básicos de la investigación en modelos animales en nuevos conocimientos y herramientas para que posibles futuras aplicaciones clínicas mejoren la salud de los pacientes con miocardiopatía de Chagas crónica. Para lo cual, en una segunda instancia se llevó a cabo una búsqueda exhaustiva de traslación de los resultados obtenidos en corazón de los modelos de infección murina a muestras de tejido cardíaco humano de pacientes con cardiomiopatía chagásica en estadio terminal. Nuestro trabajo aporta evidencia significativa con respecto a la participación de la vía purinérgica en el contexto de la infección cardíaca humana. Los resultados obtenidos demuestran que eje HIF-1 α /CD73 estaría relacionado a la persistencia del parásito y la progresión de la miocarditis crónica ya que la producción de ADO llevaría a la inmunorregulación, favoreciendo la cronicidad de la infección y consecuente inflamación que provocaría daño tisular, pero sería ineficiente para la erradicación del parásito. Estos hallazgos son consistentes con reportes previos que demuestran una correlación positiva entre la persistencia del parásito y la intensidad del infiltrado inflamatorio en la miocarditis chagásica [64-67].

La inmunidad montada por el huésped infectado es sumamente compleja y resulta crítica para controlar tanto la infección aguda como la progresión hacia la patología crónica [214]. La respuesta inmune de la mayoría de los pacientes es eficiente para controlar la infección aguda y reducir la parasitemia, pero falla en eliminar el parásito completamente. En la actualidad, todavía no se conocen con precisión la causa por la cual solo el 30% de los pacientes asintomáticos crónicos progresan al desarrollo de la cardiomiopatía. Los mecanismos involucrados en la inmunopatología mayormente estudiados se pueden clasificar en: mecanismos pro-inflamatorios y antiparasitarios exacerbados y mecanismos regulatorios alterados por los cuales la respuesta inmune se vuelve ineficiente en erradicar la infección e incluso resulta perjudicial dañando los tejidos [215].

La correcta funcionalidad de tejido cardíaco depende de adecuados niveles energéticos, ya que los cardiomiocitos se contraen incesantemente para garantizar el flujo sanguíneo y el oxígeno a todos los órganos. Para cumplir esta demanda energética alta, el corazón utiliza diferentes sustratos para producir ATP, condición importante en situaciones de estrés agudo o crónico. En estado basal, el ATP se encuentra casi exclusivamente en compartimentos intracelulares, alcanzando concentraciones milimolares, pero luego de la inflamación inducida por la infección, el ATP se libera al medio extracelular, donde actúa como una potente molécula de señalización inmune [121]. Una vez liberado, el ATP es degradado a AMP y luego a ADO a través de la acción de las ectoenzimas CD39 y CD73 respectivamente. El sistema purinérgico es ampliamente reconocido por sus funciones metabólicas y, en la última década, ha adquirido importancia su rol como vía de señalización para la modulación de la respuesta inmune. Durante la infección, el influjo de células inmunes consume gran cantidad de oxígeno y las células isquémicas responden rápidamente modulando la expresión de las enzimas purinérgicas [133, 148].

Crecientes líneas de evidencia demuestran que HIF es un factor crítico para la regulación positiva de la glicólisis, que permite que las células inmunes innatas produzcan ATP en un medioambiente anaeróbico [216]. Existen reportes que demuestran que la actividad del HIF-1 α en condiciones de normoxia puede ser regulada por el incremento de la S-nitrosilación mediada por NO y la estabilización de HIF-1 α [217]. Asimismo, estudios recientes proponen que HIF-1 α tendría un rol protector en la infección por *Leishmania major* por su rol pro-inflamatorio debido a que es requerido para la producción de NO por los macrófagos activados con LPS/IFN- γ por lo cual sería una fundamental colaboración en la respuesta inmune microbiciada montada por el huésped [218]. Resultados previos del grupo en pacientes asintomáticos con enfermedad de Chagas crónica revelaron una mayor frecuencia de monocitos que expresan HIF con respecto a los donantes control y, a su vez, mayor expresión de IL-1 β y NO, este último podría generar una retroalimentación positiva estabilizando la subunidad α de HIF y perpetuando un estado inflamatorio crónico. Asimismo, luego de la infección el incremento de la expresión de CD39 y CD73 en los monocitos podría ser mediado por la actividad de HIF lo cual generaría la producción de ADO, metabolito purinérgico capaz de inhibir funciones microbicidas tanto de células mieloides como de células linfoides [161]. Por otro lado, observamos una disminución en la

expresión de las ambas enzimas purinérgicas en linfocitos circulantes de los pacientes seropositivos comparado con los pacientes control [160]. En este mismo sentido, antecedentes previos reportan una disminución de la actividad de las enzimas e-NTDPasa y eADA por parte de los linfocitos circulantes de pacientes con la forma indeterminada de la enfermedad de Chagas crónica y un incremento en los niveles de ADO en suero [219].

Cabe destacar que numerosos estudios han revelado funciones fisiológicas importantes de la ectoenzima CD73 que son independientes de su actividad como AMPasa, incluyendo que: activa a las células T actuando como una molécula de señalización coestimuladora [220]; facilita la unión de linfocitos al endotelio [221] induce la clusterización de integrinas [222]; promueve la resistencia de las células leucémicas a la apoptosis a través de mecanismos dependientes del anclaje a la membrana mediado por GPI [223]; induce la fosforilación de proteínas endoteliales y de linfocitos en respuesta a la unión de anticuerpos [224, 225]; e inhibe la metástasis de las células de cáncer de mama tras la clusterización de las ectoenzimas en la membrana e internalización mediada por un anticuerpo anti-CD73 [226]. En el presente trabajo hemos considerado que CD73 es la enzima limitante en la generación de ADO extracelular, pero se debe tener en cuenta que además de modular el microambiente purinérgico local, otras funciones fisiológicas de dicha ectoenzima posiblemente también podrían estar alteradas.

En lo que respecta a la degradación sucesiva de ATP, ADO extracelular representa un mecanismo de retroalimentación reguladora que limita el daño del tejido al contrarrestar las acciones proinflamatorias de ATP, pero también contrarresta las respuestas microbicidas de las células inmunes [227]. Schrader y colaboradores argumentan que la ADO formada por la acción de CD73 en células T inhibe la inflamación y fibrosis cardíaca conservando la función cardíaca y previniendo el desarrollo de insuficiencia cardíaca después de constricción aórtica transversa (TAC) [228]. De este modo, ADO es un potente mensajero extracelular que se produce en altas concentraciones en condiciones metabólicamente desfavorables. La hipoxia tisular, como consecuencia de un estado de energía celular comprometido, es seguida por la descomposición acelerada de ATP que conduce a la liberación de ADO. A través de la interacción con sus receptores de membrana (ADORA), ADO se encarga de la restauración del homeostasis tisular [167].

Muchos estudios han demostrado que los mecanismos inmunorreguladores son claves para el control de la infección, posiblemente afectando la morbilidad de la enfermedad crónica [229, 230]. Un equilibrio entre las respuestas Th1 y Th2 modula la resistencia del huésped y el desarrollo de la enfermedad de Chagas crónica. La regulación negativa de la producción de citoquinas pro-inflamatorias acompañada de la inducción de una respuesta de tipo Th2 no protectora puede ser una consecuencia inmunológica importante de la adaptación del huésped a la infección. En este sentido, Araujo y colaboradores reportaron que los pacientes con la forma indeterminada de la enfermedad de Chagas crónica tienen porcentajes más altos de la población de células T regulatorias que secretan IL-10 comparado con los pacientes que presentan la cardiomiopatía crónica. Estos datos sugieren que un aumento en la IL-10 liberada por las células T reguladoras durante la fase crónica de la enfermedad puede estar asociada con la protección del huésped contra el daño tisular severo inducido por la respuesta inmune Th1 [229]. Del mismo modo, otros estudios reportaron que pacientes seropositivos y asintomáticos presentaban una menor capacidad para estimular las células T CD4, lo que representa un mecanismo clave para controlar la reacción inflamatoria y, en consecuencia, presentaron menor daño tisular. Además, se observó una respuesta proliferativa ligeramente menor de las células T CD4 a la estimulación con los antígenos parasitarios en los pacientes seropositivos con respecto a los pacientes con enfermedad cardíaca. Conjuntamente, el análisis de la expresión de citoquinas reveló que un mayor porcentaje de monocitos de los pacientes seropositivos presentan expresión de IL-10, en cambio los monocitos de pacientes con enfermedades cardíacas expresan TNF luego de la estimulación con parásitos vivos.[231].

Deben tenerse en cuenta varios aspectos de la respuesta inmune y, aunque en general es muy importante amortiguar la inflamación, en algunas circunstancias, como el caso de las infecciones crónicas y el cáncer, también es necesario potenciar la actividad de las células inmunes contra los patógenos o células malignas. Consideramos que la persistencia crónica del parásito en el tejido lleva a una sostenida respuesta inflamatoria crónica que resulta crítica en la inducción del daño tisular asociado a la cardiomiopatía de Chagas crónica. En los explantes de tejido cardíaco se encontró una fuerte correlación entre el grado de miocarditis de los pacientes, la concomitante persistencia local de parásitos y la expresión de HIF-1 α /CD73 en células mononucleares infiltrantes. Esto conduce a pensar que el

microambiente del corazón infectado regula la respuesta inmune al modular la velocidad de formación y degradación extracelular de los metabolitos purinérgicos. De la misma manera que numerosos autores citados en esta tesis, consideramos que la respuesta inmune crónica contra el parásito también puede inducir la acumulación de daño tisular y fibrosis. Sin embargo, creemos que a la hora de controlar la inflamación se debe tener en cuenta el fino balance entre respuesta inflamatoria y respuesta anti-parasitaria. Por lo tanto, las enzimas productoras de ADO, que se definen como sensores de los cambios metabólicos en el entorno tisular local, pueden ser objetivos muy importantes para la modulación de la respuesta inmune. Este mecanismo podría ser de gran interés terapéutico para promover la erradicación del parásito y mejorar la enfermedad crónica.

Conclusión

En los últimos años se han logrado grandes avances en la comprensión de la biología de las células inmunes y su rol en la inmunidad anti-parasitaria, así como también se ha avanzado ampliamente en el campo de estudio de los mecanismos de cardioprotección, sin embargo, todavía se desconoce la combinación correcta de funciones efectoras de la respuesta inmune que logran la eliminación fehaciente de *T. cruzi* en el tejido cardíaco.

La investigación que se llevó a cabo tiene especial relevancia debido a que se determinaron la magnitud y los mecanismos a través de los cuales el sistema purinérgico modifica la respuesta inmune. En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis indican que el sistema purinérgico en general, y la enzima CD73 en particular juega un rol clave en la modulación de la respuesta inmune y que en el tejido cardíaco promovería la regulación negativa de la respuesta inmune anti-*T. cruzi*. A su vez, en la enfermedad de Chagas crónica humana pudimos corroborar la cercana relación entre tres ejes esenciales en el desarrollo de la manifestación clínica más severa: la persistencia del parásito en el tejido cardíaco, el influjo de células inmunes que contribuyen al estado inflamatorio crónico y el incremento de mecanismos inmunorregulatorios del cual son partícipes el factor de transcripción HIF y la ectoenzima CD73.

Es necesario comprender qué perfil de respuesta inmunológica resulta beneficioso para el huésped estableciendo un mejor equilibrio entre la eliminación del parásito y el daño tisular. Este conocimiento fundamental nos permitiría desarrollar estrategias racionales para estimular correctamente el sistema inmune contra el parásito y así prevenir la cardiopatía chagásica crónica. Este estudio posibilita sentar las bases y evidencias para contribuir al desarrollo de nuevas estrategias tendientes a resolver este importante problema de la salud humana y realizar sustanciales aportes al conocimiento de la relación entre la biología del tejido cardíaco y la inmunidad anti-parasitaria.



CAPÍTULO

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización del rol de adenosina en la respuesta inmune cardíaca a la infección por *Trypanosoma cruzi* y efecto de su manipulación en la progresión de la miocardiopatía chagásica.

PARTE 1: Modelo de infección experimental

Declaración de Bioética

Todos los experimentos con animales de laboratorio se llevaron a cabo con la aprobación de manejo de animales y procedimientos experimentales por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-Res: 736/2018) de CIBICI-CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (Córdoba, Argentina) siguiendo la recomendación de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del National Institutes of Health, Estados Unidos y bajo estricta conformidad con la Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación del INTA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – Argentina).

Animales de laboratorio

Los ratones C57BL/6J (*Wild Type*: WT) se obtuvieron de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Los ratones deficientes en CD73 (CD73KO B6.129S1-Nt5etm1Lft / J - JAX # 018986) se adquirieron en *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Estados Unidos) [232]. Los animales se mantuvieron alojados en el Centro de Animales de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba número de aprobación National Institutes of Health- USA: OLAW-NIH F16-00193 (A5802-01). Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a agua y alimento en todos los experimentos realizados. Los ratones fueron anestesiados con isofluorano para llevar a cabo los diferentes experimentos.

Genotipificación de animales genéticamente modificados

Los ratones deficientes en CD73 (CD73KO B6.129S1-Nt5etm1Lft / J - JAX # 018986) empleando el protocolo de genotipificación sugerido por *The Jackson Laboratories*. Brevemente, ADN genómico fue extraído de tejido obtenido de las orejas de los ratones, para luego llevarse a cabo dos PCR convencionales mediante la utilización de los siguientes primers y protocolo detallado a continuación.

Tipo de Primer	Secuencia 5' --> 3'	Reacción de PCR
Mutante Forward	GCTACTTCCATTTGTCACGTCC	Reacción A
Primer común	TACCGTTGGCTGACCTTTGT	Reacción A + B
<i>Wild type</i> Forward	GTTTTGATGCGTTCTGCAAG	Reacción B

Reacción A

Componentes de reacción	Concentración final
ddH ₂ O	
Kapa 2G HS buffer	1.3 X
MgCl ₂	2.6 mM
dNTPS-kapa	0.26 mM
Primer mutante Fw	0.5 uM
Primer común	0.5 uM
Glicerol	6.5 %
Dye	1 X
Kapa 2G HS taq polimerasa	0.03 U/uL
ADN	50-200 ng

Ciclos

Paso #	Temp°C	Tiempo	Notas
1	94	2 min	
2	94	20 seg	
3	65	15 seg	Disminución de - 0.5 C por ciclo
4	68	10 seg	
5			Se repiten pasos 2-4 por 10 ciclos
6	94	15 seg	
7	60	15 seg	
8	72	10 seg	
9			Se repiten pasos 6-8 por 28 ciclos
10	72	2 min	
11	10		espera

Reacción B

Componentes de reacción	Concentración final
ddH ₂ O	
Kapa 2G HS buffer	1.3 X
MgCl ₂	2.6 mM
dNTPS-kapa	0.26 mM
Primer <i>wild type</i>	0.5 uM
Primer común	0.5 uM
Glicerol	6.5 %
Dye	1 X
Kapa 2G HS taq polimerasa	0.03 U/uL
ADN	50-200 ng

Ciclos

Paso #	Temp°C	Tiempo	Notas
1	94	2 min	
2	94	20 seg	
3	65	15 seg	Disminución de - 0.5 C por ciclo
4	68	10 seg	
5			Se repiten pasos 2-4 por 10 ciclos
6	94	15 seg	
7	60	15 seg	
8	72	10 seg	
9			Se repiten pasos 6-8 por 28 ciclos
10	72	2 min	
11	10		espera

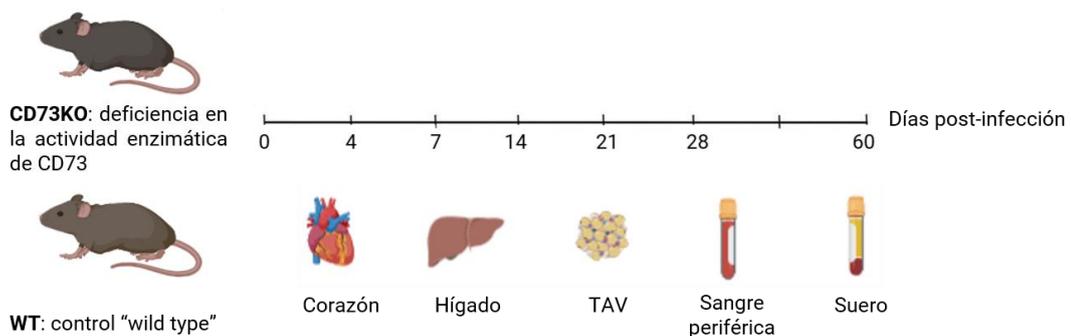
Luego, los productos de PCR fueron evaluados mediante una electroforesis en gel de agarosa teniendo en cuenta para el gen de CD73 las siguientes consideraciones: gen CD73 mutante posee ~350 bp, *Wild type* = ~235 pb y heterocigota = 235 bp y ~350 bp. Los resultados obtenidos se presentan en el Anexo I.

Parásitos e infección experimental

Los parásitos de *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuen) se mantuvieron tanto en condiciones *in-vitro* como *in-vivo* mediante pases seriados en cultivos de células VERO o de ratón a ratón en animales susceptibles (cepa BALB/c). Para la obtención de tripomastigotes de sangre de ratones infectados para pase se centrifugó durante 10 minutos a 2200 rpm para separar la masa globular del suero y se colocó durante 2 h en estufa de 37°C. Durante el tiempo transcurrido, los parásitos móviles migraron de la zona globular al suero. Posteriormente se separó el suero rico en tripomastigotes y se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos. El pellet de parásitos se lavó dos veces con RPMI 1640 siguiendo el mismo proceso de centrifugación a altas velocidades y luego se resuspendió en RPMI 1640 completo. La cuantificación de los mismos se realizó en cámara de Neubauer.

Hembras y machos de seis a ocho semanas de edad de ratones CD73KO y/o su base genética WT fueron infectados por vía intraperitoneal (i.p) con 1000 tripomastigotes de *T. cruzi*. Cuando el experimento lo requería se utilizaron ratones control no infectados. Los controles de sobrevivencia se realizaron generalmente cada 24- 48 horas evaluando el estado general de los animales. Según las normas de cuidado de animales, los ratones que mostraron una pérdida del peso corporal de más del 20% del peso original fueron sacrificados.

Modelo experimental de infección con *Trypanosoma cruzi*



Análisis histológico de tejido adiposo visceral

Los tejidos adiposos viscerales (TAV) se fijaron en buffer de formalina al 10% y se incluyeron en parafina para la tinción con hematoxilina / eosina (H&E). Secciones de cinco micras (5 µm) de espesor fueron examinadas mediante microscopía de luz Nikon Eclipse TE 2000 U equipada con una cámara de video digital. El análisis de la morfometría del tejido adiposo

visceral se realizó utilizando el software de análisis de imágenes ImageJ con el módulo de complemento "*Measure and Label Macro*" [233].

Determinación de parasitemia

Para la determinación de la parasitemia, se contaron en cámara de Neubauer los tripomastigotes móviles presentes en la muestra de sangre de ratones infectados con una solución de cloruro de amonio al 0.87% que puede lisar los glóbulos rojos de la muestra.

Análisis histológico y marcadores de daño cardíaco

Se extrajo sangre por punción intracardíaca a ratones CD73KO y WT previa anestesia con isofluorano a diferentes dpi. Luego, a cada animal se lo perfundió con bomba a flujo constante con buffer fosfato salino frío pH 7,4 con (PBS Gibco) por 5 minutos para eliminar la sangre circulante. Los corazones fueron fijados en buffer formalina al 10% y luego fueron incluidos en parafina. Secciones de cinco micras (5 μ m) de espesor fueron teñidas con hematoxilina de Mayer por 10 minutos, luego embebidas en agua corriente y lavadas con agua destilada. Posteriormente, se realizó una contracoloración con eosina 0,2% por 2 minutos, montada con medio de montaje. Las improntas fueron examinadas mediante microscopía de luz Nikon Eclipse TE 2000 U equipada con una cámara de video digital. La sangre anticoagulada con heparina fue centrifugada a 3500 rpm por 5 minutos. Las muestras de plasma se enviaron al laboratorio Biocon (Córdoba, Argentina) para medir ALT (alanina aminotransferasa), AST (aspartato aminotransferasa), creatina quinasa total (CK), isoenzima CK-MB por metodología cinética (UV- 37°C) como marcadores bioquímicos de daño hepático y cardíaco.

Aislamiento de células inmunes en tejido cardíaco

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se puso a punto el protocolo de aislamiento de leucocitos infiltrantes y caracterización fenotípica de macrófagos cardíacos en ratones infectados con *T. cruzi*, el cual fue publicado en *Eberhardt et al (2019)* [234]. Brevemente, en los puntos de tiempo indicados los corazones infectados se pesaron y se disgregaron mecánica y enzimáticamente con una solución de tripsina al 0,25% (Sigma-Aldrich) por 30 minutos. El tejido disgregado se presionó suavemente a través de un filtro de células (70 μ m; BD Falcon). Las células mononucleares y los granulocitos se aislaron mediante centrifugación a 600 g por 30 minutos con gradiente de densidad Percoll con bicapa al 35%

y al 70% (GE Healthcare). El recuento de células viables se determinó mediante exclusión con tinción de azul de Tripán utilizando una cámara de Neubauer.

Aislamiento de células inmunes en tejido adiposo visceral

El tejido adiposo visceral fue extraído post-perfusión de los animales y los pesos de los tejidos húmedos se tomaron utilizando una balanza analítica. Luego, las muestras se disgregaron con bisturí y se digirieron enzimáticamente durante 45 minutos a 37 ° C con colagenasa de tipo II (0,8 mg / ml; Sigma-Aldrich) en una solución buffer salina de Hanks. Posteriormente, se les adicionaron buffer fosfato salino suplementado con FBS (suero fetal bovino) al 10% para detener la reacción enzimática, se centrifugaron a 1800 rpm por 5 minutos y filtraron a través de un filtro de células (70 µm; BD Falcon) para obtener la fracción estromal vascular del sobrenadante. El recuento de células viables se determinó mediante exclusión con tinción de azul de Tripán utilizando una cámara de Neubauer.

Aislamiento de células inmunes en tejido hepático

Se aislaron células inmunes de tejido hepático siguiendo el protocolo que se describió anteriormente [170]. Brevemente, los hígados se obtuvieron en PBS (Gibco) inmediatamente posterior a la perfusión de los animales y se disgregaron a través de mallas de nylon de 100 µm. Los eritrocitos fueron lisados utilizando buffer de lisis (Gibco). Los hepatocitos se separaron de las células inmunes con un gradiente de densidad de Percoll con bicapa del 35% y 70% centrifugando a 600 g por 30 minutos (GE Healthcare) y el recuento de células vivas se llevó a cabo mediante la tinción con azul de Tripán en una cámara de Neubauer.

Análisis de citometría de flujo

Para la tinción de citometría de flujo de las suspensiones celulares obtenidas de los tejidos infectados de ambos grupos experimentales se utilizaron los siguientes anticuerpos: monoclonales de rata dirigidos contra ratón anti-CD45 APC; anti-F4/80 PE; anti-F4/80 PeCy7; anti-CD86 APCCy7; anti-CD206 PECy7; anti-CD11b APC; anti-CD3 FITC; anti-CD8 PE; anti-CD4 APCCy7; anti-Ly6C PECy7, anti-Ly6G APCCy7; anti-CD19 FITC, anti-CD73 PerCPcy5.5; anti-CD39 PerCP-eFluor710; anti-CD39 biotina y anticuerpo policlonal de conejo anti-CD73 por 45 minutos a 4° C (BioLegend, BD Biosciences, eBioscience y Abcam). Luego, las células se lavaron e incubaron con estreptavidina-FITC o anticuerpo anti-IgG de conejo Alexa 488, Alexa

555 o Alexa 647 durante 15 minutos. Finalmente se lavaron y resuspendieron en PBS + 3% suero fetal bovino (SFB).

Para evaluar la expresión de citoquinas y enzimas intracelulares, las muestras se trataron con Golgi Stop/ Golgi Plug durante 4 horas a 37 ° C, se fijaron y se permeabilizaron con *BD Cytofix/ Cytoperm* y *Perm/ Wash* (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las células se lavaron e incubaron con los siguientes anticuerpos: monoclonal de rata dirigidos contra ratón anti-IL10 APC; anti-IFN- γ PerCPCy5.5; anti-IL-12 APC; anti-CD107a FITC; anti-Arginasa-1 (Arg-1) PE (R&D) y anticuerpo monoclonal de conejo dirigido contra ratón anti-iNOS/NOS Tipo II por 30 minutos a 4° C (eBioscience, BD Biosciences y BioLegend). Finalmente, las células se lavaron y se incubaron con anticuerpo anti-IgG de conejo Alexa Fluor 488, Alexa 555 o Alexa 647 durante 15 minutos según disponibilidad de canales del citómetro. Para evaluar la expresión del factor de transcripción FoxP3 se utilizó el kit *Transcription Factor Staining Buffer Set* (eBiosciences) para fijar y permeabilizar las células siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La tinción de sangre periférica heparinizada se realizó con los siguientes anticuerpos: monoclonal de rata dirigido contra ratón anti-CD11b APC; anti-Ly6C PECy7; anti-Ly6G APCCy7; anti-CD4 APCCy7; anti-CD8 PE; anti-CD19 FITC; anti-P2x7 PECy7; anti-CD39 PerCPe-Fluor 710 y anticuerpo policlonal de conejo anti-CD73 y por 45 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células se incubaron con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo Alexa 647 durante 15 minutos y los glóbulos rojos se lisaron con buffer de lisis (Gibco). Para la medición de producción de especies reactivas se utilizaron las sondas DAF-FM y H₂DCFDA (ThermoFisher Scientific) según las instrucciones del fabricante. Los datos de marca comercial, especificidad, clon y catálogo de cada reactivo utilizado para citometría de flujo se detallan en el Anexo II.

Las muestras teñidas se adquirieron con los citómetros FACS Canto II (Becton Dickinson) y BD LSR Fortessa (BD Biosciences), los datos fueron obtenidos por el programa BD FACSDiva y analizados con el software FlowJo 10 (Tree Star, Inc.).

Determinación de citoquinas por ELISA

Para obtener los lisados, los tejidos de ratones a distintos días post-infección se incubaron con buffer de lisis RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150

mM, Triton x-100 1%, desoxicolato de sodio 1%, SDS 0.1%, EDTA 1 mM, inhibidores de proteasas 1mM, PMSF 1mM y ortovanadato 1mM, pH 7.4) durante 30 minutos en hielo y luego, se centrifugaron a 14.000 g por 15 minutos y se recuperaron los sobrenadantes.

La técnica de ELISA sándwich se realizó para la cuantificación de los niveles de IL-17A, IL-4, IL-10, TNF, IL-1 β , IL-6, IFN- γ e IL-12 en lisados de tejido cardíaco de ratones CD73KO y WT. Brevemente, las placas de ELISA se recubrieron con anticuerpos anti-citoquinas de ratón (BD Pharmingen® y e-Bioscience®) durante la noche (8 horas), luego se lavaron con PBS / Tween al 0.05% y se bloquearon los sitios libres con albúmina durante 1 hora. Las curvas estándar se generaron utilizando citoquinas recombinantes de ratón (BD Pharmingen® y e-Bioscience®). Las muestras y los estándares de citoquinas se incubaron durante la noche a 4° C. Después del lavado, las placas se incubaron con anticuerpo anti-citoquina de ratón biotinilado (BD Pharmingen® y e-Bioscience®) durante 1 hora a temperatura ambiente y luego, previamente lavadas, se les añadió estreptavidina-peroxidasa (BD Pharmingen®) durante 30 minutos. La reacción se reveló utilizando un kit de cromógeno TMB y sustrato de la enzima H₂O₂ (Dako), antes de leer a 450 nm en un lector de microplacas (BioTek). La concentración de proteínas totales de las muestras de corazón se determinó mediante el método de Bradford (Bio-Rad). Los datos se expresaron como la media de la proporción de citoquina por mg de proteínas cardíacas totales.

Medición de óxido nítrico

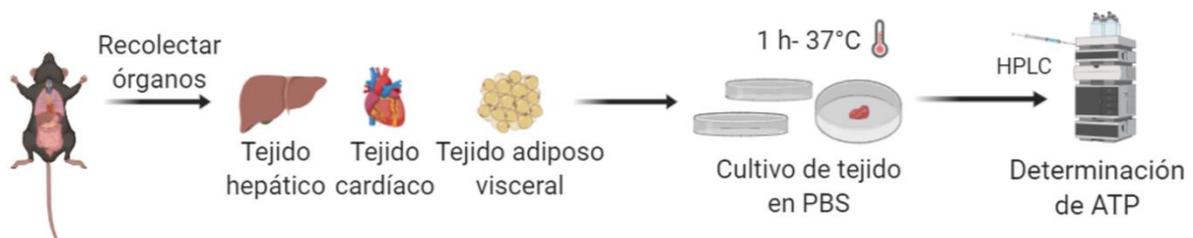
Los niveles de nitrato/nitrito se midieron espectrofotométricamente mediante la reacción de Griess para cuantificar la cantidad de óxido nítrico (NO) en plasma y lisados de tejido en buffer RIPA. Brevemente, se agregaron 30 μ l. de reactivo de Griess (Sigma Aldrich) que convierte los nitratos en nitritos a 30 μ l. de lisados de tejido o plasma, y se leyó la absorbancia después de 15 minutos a 540 nm utilizando un lector de placas automatizado (BioTek). Se realizó una curva estándar de NaNO₂ para realizar una regresión lineal de la curva y calcular la concentración de nitrito en las muestras. En paralelo, se determinó la concentración de proteínas totales de las muestras de tejido mediante el método de Bradford (Bio-Rad).

Cuantificación de carga parasitaria por PCR

Para determinar el parasitismo tisular, se purificó el ADN genómico de corazón, hígado y TAV infectados a diferentes días post-infección usando el reactivo TRIzol (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN satélite de *T. cruzi* se cuantificó mediante PCR en tiempo real utilizando un ensayo específico de expresión de genes con sondas Taqman (Applied Biosystem®) y primers con secuencias descritas en *Piron et al (2007)* [235]. Se amplificó una muestra que contenía 2 µg. de ADN genómico, la abundancia de ADN satélite de *T. cruzi* se normalizó a la expresión de GAPDH (Reactivo de Control de GAPDH de Roedor Taqman, Applied Biosystem) o 18S (Reactivo de control de ARNr 18S endógeno, Applied Biosystems) y se expresó como unidades arbitrarias (UA).

Cuantificación de ATP

Para medir los niveles de ATP extracelular liberado por tejidos blanco infectados, los mismos se pesaron inmediatamente después de la perfusión sanguínea y sacrificio de los ratones. Los tejidos se lavaron tres veces con PBS y se incubaron en 10 veces el volumen (peso/volumen) durante 1 hora a 37 ° C en PBS estéril (Gibco) suplementado con antibióticos adaptando la metodología de un protocolo previamente descrito [206].



Los sobrenadantes de cada órgano y plasmas se recolectaron para la determinación de las concentraciones de ATP mediante el Kit de determinación de ATP (Invitrogen™), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras se incubaron con una mezcla de reacción luminiscente a temperatura ambiente durante 15 minutos en una placa blanca de 96 pocillos protegida de la luz. La luminiscencia se midió a 560 nm en un lector multimodo Synergy-2 (BioTek). Se realizó una curva estándar de ATP (Sigma-Aldrich) para realizar una regresión lineal de la curva y calcular la concentración de ATP según lo indicado por el fabricante del kit.

Medición de niveles de ADO por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La adenosina liberada en el sobrenadante de tejidos infectados se determinó mediante análisis de HPLC. La cuantificación analítica de ADO en las muestras se realizó utilizando el sistema HPLC HP 1220 de Agilent equipado con una bomba isocrática y un detector de longitud de onda variable a 257 nm, con la adquisición y el procesamiento de datos mediante el software Agilent BootP. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo utilizando una columna de fase inversa Phenomenex C18 (150 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 µm). El ensayo se realizó con ácido fosfórico al 0,4%: metanol (95:5, v/v) como fase móvil a una velocidad de flujo de 0,8 ml/minuto en el modo isocrático. Para el análisis, se inyectaron 10 µl. de cada muestra y el tiempo de ejecución se estableció en 10 minutos. Todas las soluciones se filtraron a través de filtros de celulosa de 0,45 µm (Millipore) y luego se cuantificaron por HPLC. Las áreas de los picos de ADO se confirmaron mediante la inyección conjunta de un estándar interno junto con las muestras analizadas. Los niveles de ADO en las muestras biológicas se cuantificaron al relacionar el área del pico analítico con la línea de regresión de la curva de calibración.

Para la curva de calibración, se preparó una solución madre de estándar de ADO 500 µM (Sigma-Aldrich®) en agua destilada. Posteriormente, se preparó una curva de calibración de seis puntos en un rango de 0.1 a 100 µM diluyendo la solución madre con PBS estéril (Gibco). Estas soluciones fueron preparadas por triplicado. La curva de calibración se construyó trazando el área del pico promedio de ADO vs. la concentración de ADO.

En cuanto a la validación del método, se evaluaron los siguientes criterios: linealidad, precisión, precisión, límite de detección (LOD), límite inferior de cuantificación (LLOQ) y estabilidad siguiendo las instrucciones de validación del método bioanalítico de la Guía para la Industria de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos. El rango de linealidad se estableció en base a tres series de ensayo diferentes de estándares de calibración recién preparados y se evaluó determinando el coeficiente de correlación (r^2) y la pendiente mediante el análisis de regresión lineal. La precisión y la precisión del método se realizaron con 15 muestras estándar a tres diferentes concentraciones (100, 5 y 0.1 µM) analizadas durante tres días consecutivos para determinar las variaciones intra- e inter-ensayo.

La exactitud y precisión se calcularon de la siguiente manera (ecuaciones 1 y 2, respectivamente):

Ecuación 1

$$E_R(\%) = \frac{[ADO]_{\text{exp}} - [ADO]_{\text{theor}}}{[ADO]_{\text{theor}}} \times 100$$

donde E_R es la exactitud; $[ADO]_{\text{theor}}$ es la concentración teórica de adenosina (μM); y $[ADO]_{\text{exp}}$ es la concentración experimental de adenosina (μM). El valor medio debe estar dentro del 15%, excepto en LLOQ, donde no debe desviarse en más del 20%.

Ecuación 2

$$CV(\%) = \frac{SD}{X_{\text{ave}}} \times 100$$

Donde CV es el coeficiente de variación; SD es la desviación estándar; y X_{ave} es el promedio de la concentración estándar. La precisión determinada en cada nivel de concentración no debe exceder el 15% del CV, excepto para el LLOQ, donde no debe exceder el 20% del CV.

El LOD se estableció mediante la evaluación visual de la concentración mínima a la que la señal de ADO puede diferenciarse de manera confiable del ruido de fondo (el pico es al menos 5 veces mayor que el ruido). El LLOQ se estableció en la cantidad más baja de ADO en una muestra que se puede determinar con una precisión y una exactitud de no menos de $\pm 20\%$.

La estabilidad de congelación/descongelación se determinó después de un ciclo de congelación (-80°C) y descongelación de tres muestras estándar en concentraciones de 100 (alta), 5 (media) y $0.1\ \mu\text{M}$ (baja), todo medido en un ensayo de un día. La estabilidad posterior a la preparación de las muestras procesadas a temperatura ambiente, incluido el tiempo en el inyector automático de muestras, se determinó utilizando tres alícuotas a diferentes concentraciones considerándose que el tiempo transcurrido promedio de muestras en el inyector automático es de 3 horas. En ambos casos, la estabilidad se determinó mediante la comparación de los resultados analíticos de las muestras en tres concentraciones (baja, media, alta), después del ciclo de congelación / descongelación o 3 horas en el inyector automático de muestras, en comparación con los estándares frescos. La estabilidad (S) se calculó con la siguiente ecuación (ecuación 3):

Ecuación 3

$$S(\%) = \frac{A_{ADO/a}}{A_{ADO/f}} \times 100$$

donde $A_{ADO/a}$ es el área de adenosina después del ciclo de congelación ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) / descongelación o después de 3 horas en el inyector automático y $A_{ADO/f}$ es el área de adenosina del estándar fresco.

Los parámetros obtenidos en la validación de la metodología de HPLC para la cuantificación de adenosina se resumen en la Tabla II.

Tabla II. Parámetros del método bioanalítico de HPLC para la cuantificación de adenosina.	
Parámetros	Resultados
Linealidad (n=6)	
<i>Rango de concentraciones [μM]</i>	0.1-100
<i>Coefficiente de correlación [r^2]</i>	1.000
<i>Regresión lineal</i>	$y = 17.68x + 0.35$
LOD [μM]	0.05
LLOQ [μM]	0.1
Precisión, %CV	$12.44 \pm 1,28\%$
Exactitud, % E_R	$3.70 \pm 0.85\%$
Estabilidad, %S	$98.96 \pm 6.21\%$
<i>Ciclo de Congelación 80°C/descongelación y</i>	
<i>Ciclo de espera en inyector automático (3 horas)</i>	
LOD: Límite de detección, LLOQ: Límite inferior de cuantificación, %CV: Coeficiente de variación, % E_R : Exactitud. Para %CV, % E_R y %S, los valores informados corresponden a la Media \pm SD % de la concentración más baja [ADO] = 0.1 μM ; Concentración media [ADO] = 5 μM y concentración más alta [ADO] = 100 μM .	

Análisis de expresión de CD73 en tejidos por inmunofluorescencia

Las muestras de tejido (corazón, TAV e hígado) de ratones WT infectados se colectaron a 7 dpi, se colocaron en formalina-PBS al 10% durante la noche y luego, se lavaron con PBS y se almacenaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en solución de PBS sacarosa al 30% para realizar cortes por criostato. Las muestras se cubrieron con OCT y se seccionaron a 5-7 μm en un crióstato Cryotome

0620E (Thermo Scientific®). Los tejidos se fijaron en acetona fría durante 10 minutos, se bloquearon con PBS BSA al 5% y se marcaron con anticuerpo primario de conejo anti-CD73 (Abcam®) y anticuerpo primario CD45 FITC. Posteriormente, se incubó con anticuerpo secundario de IgG anti-conejo Alexa 555 durante 60 minutos, los núcleos celulares fueron teñidos con Hoescht. Las imágenes se obtuvieron con el microscopio confocal Olympus FLUOVIEW FV1200. La intensidad de fluorescencia media (MFI) /célula se cuantificó en 10 campos de alta potencia (HPF) (con lente objetivo 60X con zoom digital 4X) haciendo una proyección en Z de las imágenes confocales y analizando el valor medio de gris de las regiones de interés (ROIs) utilizando el software Image J. La fluorescencia dada por el anticuerpo secundario y por la autofluorescencia tisular se restó utilizando los controles apropiados.

Análisis estadístico

La significancia estadística de las comparaciones de los valores medios entre dos grupos se evaluó mediante una prueba *t de Student* de dos colas. Para comparar diferentes grupos de condiciones experimentales, se realizó el análisis de la varianza empleando ANOVA (ANOVA de una o dos vías) asociado a la prueba post hoc de Bonferroni o Tukey. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 7. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: *no significativo*; ND: *no detectable*).

PARTE 2: Experimentos con muestras de pacientes

Declaración de Bioética

Para poder llevar a cabo los estudios en la población de pacientes con enfermedad de Chagas crónica se obtuvieron los consentimiento informados por escrito de los pacientes y se obtuvo la autorización y aprobación por parte del Comité de Ética de las instituciones participantes: protocolo aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud del Adulto, Ministerio de Salud de Córdoba (Número de acta 194/2014) y protocolo aprobado por los Comité de Bioética (Acta 532/14 de la Fundación Favaloro). Este estudio cumplió con todos los principios expresados en la Declaración de Helsinki.

Selección de población estudiada

Se recolectaron muestras de tejido cardíaco provenientes de pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica severa (hombres n=14 y mujeres n=4; Media de edad + DE= 51,5 ± 8,8 años; rango de 39 a 68 años), quienes fueron admitidos en el Hospital Universitario Fundación Favaloro en Buenos Aires, Argentina, durante el período de 1998-2014 para ser sometidos a transplante ortotópico de corazón. El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* se basó en la demostración de anticuerpos anti-*T. cruzi* por la reactividad positiva en al menos 2 de 3 pruebas serológicas estándar (ELISA, prueba de hemaglutinación indirecta, y la prueba de inmunofluorescencia indirecta). La determinación de la miocardiopatía de la enfermedad de Chagas se basó en los hallazgos clínicos y electrocardiográficos.

Generalmente se suele clasificar la insuficiencia cardíaca de los pacientes según la gravedad de sus síntomas. A continuación, la Tabla III describe el sistema de clasificación más comúnmente utilizado, la Clasificación funcional de la *New York Heart Association (NYHA)*, la cual coloca a los pacientes en una de las cuatro categorías según la cantidad de limitaciones durante la actividad física.

Tabla III. Etapas de la insuficiencia cardíaca y clasificaciones funcionales según la New York Heart Association (NYHA)	
Clasificación funcional	Descripción de los síntomas relacionados con la IC
Clase I	Pacientes con enfermedad cardíaca, pero sin limitación de la actividad física. La actividad física normal no causa fatiga indebida, palpitaciones (latidos cardíacos rápidos o fuertes), disnea (falta de aire al respirar) o dolor de angina (dolor de pecho).
Clase II	Pacientes con enfermedad cardíaca que produce una ligera limitación de la actividad física. Se sienten cómodos en reposo. La actividad física ordinaria produce fatiga, palpitaciones, disnea o dolor de angina.
Clase III	Pacientes con enfermedad cardíaca que produce una marcada limitación de la actividad física. Se sienten cómodos en reposo. Cualquier actividad física leve causa fatiga, palpitaciones, disnea o dolor anginoso.
Clase IV	Pacientes con enfermedad cardíaca que no pueden realizar ninguna actividad física sin incomodidad. Los síntomas de insuficiencia cardíaca o el síndrome de angina pueden estar presentes incluso en reposo. Si se realiza alguna actividad física, aumenta la incomodidad.

Asimismo, según la guía del Ministerio de Salud de la Nación, es posible utilizar la estatificación de Kuschmir como forma de evaluar el grado de afectación cardiovascular [236]. De acuerdo a ésta, los pacientes pueden ser clasificados en los siguientes estadios:

- **Estadio 0:** serología reactiva, con ECG y telerradiografía de Tórax normales.
- **Estadio I:** serología reactiva, con ECG anormal y telerradiografía de Tórax normal.
- **Estadio II:** serología reactiva, ECG y telerradiografía de Tórax anormales.
- **Estadio III:** serología reactiva, ECG y telerradiografía de Tórax anormales, más signos y/o síntomas de insuficiencia cardíaca.

Los pacientes presentaban una fase terminal de la cardiomiopatía de Chagas en estadio III. A su vez, todos los pacientes se encontraban en clase II a IV de la clasificación de la New York Heart Association con síntomas de insuficiencia cardíaca moderada a grave. Los pacientes

que fueron incluidos en este estudio no recibieron fármacos inmunosupresores, terapia con benznidazol, ni terapia profiláctica pre-trasplante.

Los datos demográficos, clínicos y anátomo-patológicos de los pacientes se obtuvieron de la base de datos del Hospital Universitario Fundación Favaloro en colaboración con el Dr. Carlos Vigliano (Jefe de Servicio Anatomía Patológica, Hospital Universitario Fundación Favaloro- Director del Departamento de Ciencias Básicas de la Patología, Instituto de Medicina Traslacional, Trasplante y Bioingeniería IMMMeTyB- CONICET) y se incorporaron a una base de datos. Los datos demográficos y clínicos de los pacientes trasplantados se detallan en la Tabla IV.

Tabla IV. Datos demográficos y clínicos de los pacientes trasplantados.						
Protocolo	Sexo	Edad	Clasificación NYHA	Peso corazón (g)	Fecha	Diagnóstico
11967	Femenino	48	IV	420	1998	CCC
13375	Masculino	41	III- IV	400	1999	CCC
22039	Femenino	59	IV	465	2002	CCC
23741	Masculino	46	III	460	2003	CCC
24246	Masculino	59	III	460	2003	CCC
26739	Femenino	61	III	335	2004	CCC
29288	Masculino	42	IV	410	2005	CCC
34048	Femenino	55	IV	480	2007	CCC
35354	Masculino	45	III	495	2007	CCC
38455	Masculino	45	III	360	2008	CCC
39962	Masculino	39	IV	485	2008	CCC
44186	Masculino	45		345	2009	CCC
51811	Masculino	58		490	2011	CCC
52279	Masculino	63	II-III	470	2011	CCC
60180	Masculino	50		510	2012	CCC
60207	Masculino	68	II	470	2012	CCC
67511	Masculino	53	III-IV	495	2013	CCC
66823	Masculino	63	IV	590	2013	CCC

Análisis de explantes de tejido cardíacos

Se llevó a cabo el análisis de 18 muestras de tejido cardíaco proveniente de pacientes con cardiopatía chagásica crónica severa en estadio III de la clasificación de Kuschnir. Los corazones explantados se pesaron (Media de peso \pm DE= 452,2 \pm 63,9 gramos; rango de 335 a 590 gramos) y se fijaron durante 72 h en el 10% buffer fosfato-formaldehído. Después de

la fijación, las secciones transmurales de toda la circunferencia del ventrículo izquierdo y derecho en un plano equidistante desde la base hasta el ápice se recogieron y fueron embebidos en parafina. Una sección de 5 µm de espesor de cada región fue teñida con hematoxilina y eosina. El tabique interventricular de cada corazón fue seleccionado para el análisis por inmunohistoquímica/inmunofluorescencia.

Clasificación de miocarditis

Para clasificar el grado de miocarditis, tomamos los criterios informados anteriormente por el Dr. Vigliano y otros [109, 171]. La miocarditis se cuantifica mediante el empleo del software ImageJ, expresándose el promedio de células positivas en 10 campos de alto aumento (400x; HPF) y según los criterios: 1) miocarditis severa cuando el número de linfocitos (CD3+) más macrófagos (CD68+) es igual o superior a la mediana 2) miocarditis moderada cuando el número de linfocitos más macrófagos se encuentra entre el percentilo 25 y la mediana ó 3) miocarditis leve cuando el número de linfocitos más macrófagos es igual o menor al percentilo 25. En este estudio se obtuvo una mediana = 24,3 y el percentilo 25 = 5,8.

Inmunofluorescencia

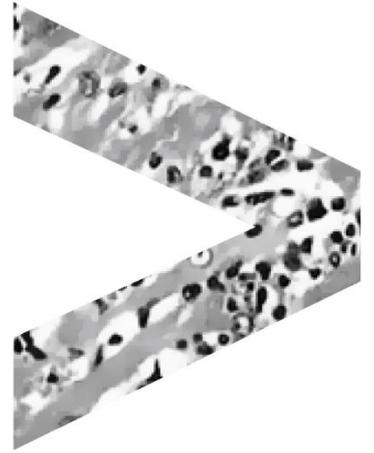
Para la caracterización de expresión de diferentes marcadores se utilizan los siguientes anticuerpos: Anticuerpo de conejo dirigido contra humano anti-HIF-1α y anti-CD73 (Abcam). Luego, los explantes se lavaron e incubaron con anticuerpo anti-IgG de conejo Alexa 555 durante 15 minutos en cámara húmeda. Todas las diluciones de los reactivos se utilizaron de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Las dobles tinciones se realizaron incubando los anticuerpos anteriormente mencionados en combinación con los siguientes anticuerpos: anticuerpos de ratón dirigidos contra humano anti-C68 y anti-CD3. Para luego del correspondiente lavado, incubar con los anticuerpos secundarios anti-ratón FITC y anti-ratón PE. Los tiempos de incubación y las concentraciones de anticuerpos se seleccionaron siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Finalmente, los núcleos de las células fueron teñidos con Hoescht por 10 minutos, lavados y montados con FluorSave (Calbiochem) para su observación con microscopio de fluorescencia Leica DMI8 equipado con una cámara de video digital. Las imágenes fueron obtenidas con el programa Leica LAS-X Software (Leica).

Cuantificación de carga parasitaria

El ADN total se purificó a partir de 25-50 mg de tejido cardíaco parafinado de pacientes con cardiomiopatía de Chagas crónica mediante columnas de fibra de vidrio *High Pure Preparation Template* de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Roche, Alemania). Luego, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qPCR) dúplex del fragmento de secuencia satélite del genoma de *T. cruzi*, utilizando primers específicos de un fragmento de ADN satélite del genoma de *T. cruzi* (5'-TGAATGGYGGGAGTCAGAG-3') y (5'-ATTCCTCCAAGMAG CGGAT-3') junto con una probe Taqman previamente descritos [237]. A su vez, se corrieron muestras control negativo de extracción y controles positivos de PCR (Control de *T. cruzi* y control exógeno IAC 0.1 pg/ μ l). Para la curva de calibración, se extrajo ADN de una biopsia parafinada de tejido endomiocárdico proveniente de un individuo no infectado en cantidad suficiente para obtener una serie de diluciones seriadas 1:10 a partir de ADN parasitario con una concentración 10^6 equivalentes parasitarios por mililitro (eq. p/mL). Estas diluciones se amplificaron con las muestras, obteniéndose así una curva de cuantificación con la misma matriz que las muestras.

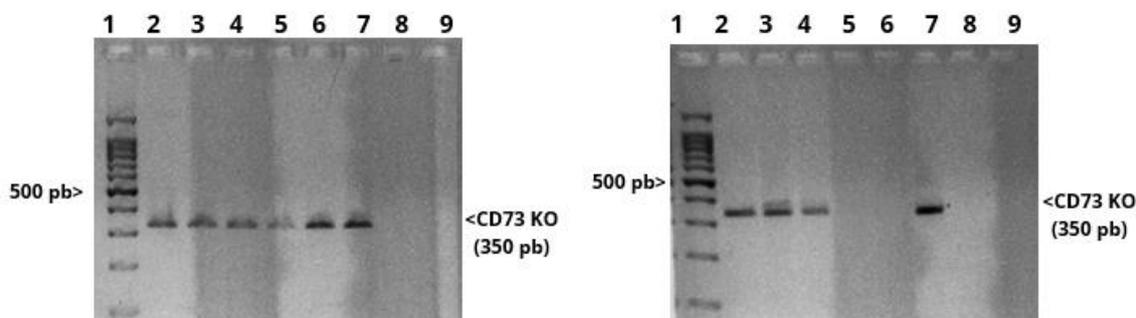
Análisis Estadístico

Las variables continuas se expresaron como medias y desviación estándar o mediana y los percentiles 25 y 75% y las variables categóricas fueron presentadas en porcentajes. Para evaluar la correlación de dos variables se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para datos paramétricos y coeficiente de correlación de Spearman para datos no paramétricos. El análisis estadístico se realizará con el software GraphPad Prism 7. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: *no significativo*; ND: *no detectable*)



ANEXOS

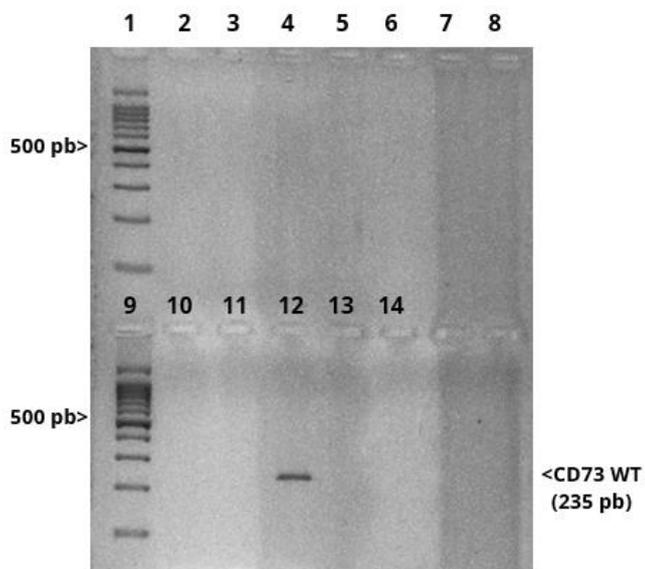
Caracterización del rol de adenosina en la respuesta inmune cardíaca a la infección por *Trypanosoma cruzi* y efecto de su manipulación en la progresión de la miocardiopatía chagásica.

Anexo I: Genotipificación de ratones modificados genéticamente CD73KO**PCR CD73 KO****Referencias:**

- 1: Ladder de ADN de 100 pb
- 2: Ratón #6 (M, C19, P3)
- 3: Ratón #7 (H, C19, P3)
- 4: Ratón #8 (H, C5, P4)
- 5: Ratón #9 (H, C5, P4)
- 6: Ratón #10 (M, C5, P4)
- 7: Control CD73 KO
- 8: Control CD73 WT
- 9: Agua

Referencias:

- 1: Ladder de ADN de 100 pb
- 2: Ratón #11 (H, C4, P5)
- 3: Ratón #12 (H, C4, P5)
- 4: Ratón #13 (M, C4, P5)
- 5: Control CD73 WT
- 6: Agua
- 7: Control CD73 KO

PCR CD73 WT**Referencias:**

- 1: Ladder de ADN de 100 pb
- 2: Ratón #6 (M, C19, P3)
- 3: Ratón #7 (H, C19, P3)
- 4: Ratón #8 (H, C5, P4)
- 5: Ratón #9 (H, C5, P4)
- 6: Ratón #10 (M, C5, P4)
- 7: Ratón #11 (H, C4, P5)
- 8: Ratón #12 (H, C4, P5)
- 9: Ladder de ADN de 100 pb
- 10: Ratón #13 (M, C4, P5)
- 11: Control CD73 KO
- 12: Control CD73 WT
- 13: Agua

Se confirmó que el genotipo de los ratones analizados corresponde a homocigoto *knockout* para el gen CD73.

Anexo II: Tabla de reactivos y anticuerpos utilizados para citometría de flujo.

Anticuerpo/ Reactivo	Clon	Marca comercial	Catálogo
Ac. anti-CD11b APC	M1/70	BD Biosciences	553312
Ac. anti-Ly6C PECy7	HK1.4	Biolegend	128017
Ac. anti-CD73 PerCP/Cy5.5	TY/11.8	Biolegend	127213
Ac. anti-CD39 biotin	5F2	Biolegend	135703
Ac. anti-CD39 PerCP eFluor 710	24DMS1	Invitrogen	46-0391-82
Ac. anti-CD45 APC	30-F11	eBioscience	17-0451
Ac. anti-F4/80 PE	BM8	Biolegend	123110
Ac. anti-CD206 PECy7	C068C2	Biolegend	141719
Ac. anti-CD86 APCCy7	GL-1	Biolegend	105029
Ac. anti-CD3e Alexa Fluor 488	145-2C11	BD Biosciences	557666
Ac. anti-CD8 PE	53-6.7	eBioscience	12-0081-82
Ac. anti-CD4 APCCy7	GK1.5	Biolegend	100414
Ac. anti-Ly6G APC eFluor 780	RB6-8C5	eBioscience	475931
Ac. anti-CD19 FITC	6D5	Biolegend	115505
Ac. anti-IL-10 APC	JES5-16E3	eBioscience	17-7101
Ac. anti-IFN- γ PerCP/Cy5.5	XMG1.2	Biolegend	505821
Ac. anti-IL-12 APC	C15.6	BD Biosciences	554480
Ac. anti-CD107a FITC	1D4B	eBioscience	531071
Ac. anti-Arginase-I PE		R&D	IC5868P
Ac. anti-iNOS/NOS Type II	iNOS/NOS Type II	BD Biosciences	610329
Ac. anti-CD73 (conejo)	policlonal	Abcam	ab175396
Ac. anti-conejo IgG Alexa 555	policlonal	Abcam	ab150078
Ac. anti-conejo IgG Alexa 647	policlonal	Abcam	ab150075
Sonda NO (óxido nítrico)	DAF-FM	ThermoFisher Scientific	D23844
Sonda ROS (especies reactivas del oxígeno)	H ₂ DCFDA	ThermoFisher Scientific	D399
Kit de fijación/ permeabilización BD		BD Biosciences	554714
Inhibidor de transporte de proteínas (Brefeldina A)		BD Biosciences	555029
Inhibidor de transporte de proteínas (Monensina)		BD Biosciences	554724

Producción científica durante el desarrollo de la Tesis Doctoral

Publicaciones

- *"Deficiency of CD73 activity promotes protective cardiac immunity against Trypanosoma cruzi infection but permissive environment in visceral adipose tissue"* **Eberhardt, N**; Sanmarco, LM; Bergero, G; Theumer, MG; García, MC; Ponce, NE; Cano, RC; Aoki, MP. BBA Molecular Basis of Disease- VSI: *Trypanosoma cruzi*- Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2019 Oct 30;165592. DOI: [10.1016/j.bbadis.2019.165592](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165592).
- *"Isolation and Phenotypic Characterization of Inflammatory Cells from Clinical Samples: Purification of Macrophages from Trypanosoma cruzi-Infected Hearts"* **Eberhardt, N**; Sanmarco, L M; Aoki M P. In: Gómez K., Buscaglia C. (eds) *T. cruzi* Infection (2019). Methods in Molecular Biology, vol 1955. Humana Press, New York, USA.
- *"Monocyte glycolysis determines CD8+ T-cell functionality in human Chagas disease"* Sanmarco, LM; **Eberhardt, N**; Bergero, G; Quebrada Palacio, LP; Martino Adami, P; Visconti, LM; Minguez, AR; Hernandez-Vazquez, Y; Carrera Silva, EA; Morelli, L; Postan, M; Aoki, MP. JCI Insight (2019) Sept 3. DOI: [10.1172/jci.insight.123490](https://doi.org/10.1172/jci.insight.123490).
- *"Pro-inflammatory monocyte profile in patients with major depressive disorder and the induction of M2 macrophage program by ketamine via NMDAR and mTOR"* Nowak, W; Grendas, LN; Sanmarco, ML; Estecho, IG; Arena, AR; **Eberhardt, N**; Rodante, DE; Aoki, MP; Daray, FM; Carrera Silva, EA; Errasti, AE. EBioMedicine (2019) 18 Nov. DOI: [10.1016/j.ebiom.2019.10.063](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.10.063).
- *"New insights into the immunobiology of mononuclear phagocytic cells and their relevance to the pathogenesis of cardiovascular diseases"*- Sanmarco, LM; **Eberhardt, N**; Ponce NE; Cano RC; Bonacci, G; DOI:[10.3389/fimmu.2017.01921](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01921).
- *"IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during Trypanosoma cruzi infection"*- Sanmarco, LM; Ponce, NE; Visconti, LM; **Eberhardt, N**; Theumer, MG; Minguez, AR; Aoki, MP. BBA Molecular basis of disease (2017) Apr;1863(4):857-869. DOI: [10.1016/j.bbadis.2017.01.006](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.01.006).
- *"IL-6 Improves the Nitric Oxide-Induced Cytotoxic CD8+ T Cell Dysfunction in Human Chagas Disease"*- Sanmarco, LM; Visconti, LM; **Eberhardt, N**; Ramello, MC; Ponce, NE; Spitale, NB; Voza, ML; Bernardi, GA; Gea, S; Minguez, AR; Aoki, MP. Frontiers in Immunology (2017) Dec 23;7:626. DOI: [10.3389/fimmu.2016.00626](https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00626).
- *"CD73 Inhibition Shifts Cardiac Macrophage Polarization toward a Microbicidal Phenotype and Ameliorates the Outcome of Experimental Chagas Cardiomyopathy"*- Ponce, NE; Sanmarco, LM; **Eberhardt, N**; García, MC; Rivarola, HW; Cano, RC; Aoki, MP. Journal of Immunology (2016) Aug 1;197(3):814-23 DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1600371>-

Becas

- Beca de Nivel Inicial para la Carrera de Doctorado - Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica. Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.
- Beca Interna de Finalización de Doctorado- Tipo II- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
- Beca otorgada para asistir a curso internacional "AAI Advanced Course in Immunology 2018" en Boston, USA llevado a cabo desde el 22 al 27 de julio de 2018. Beca de obtenida por concurso y financiada por la *American Association of Immunologists* (AAI) y la *International Union of Immunological Societies* (IUIS).
- Beca otorgada por Novartis y la Universidad de Basilea para la participación en el programa "Next Generation Scientist" de 3 meses en la empresa Novartis, Suiza.

Cursos de posgrado

- "*Curso teórico-práctico introductorio al procesamiento y análisis de imágenes científicas de fluorescencia empleando Image J/ Fiji*" Organizado por la Escuela de Posgrado y la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- "*AAI Advanced Course in Immunology 2018*" Organizado por la Asociación Americana de Inmunología (AAI) y la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS), desde el 22 al 27 de julio de 2018 en Boston, MA, USA.
- "*Nuevos enfoques para la terapia antimicrobiana*" Organizado por Facultad de Ciencias Químicas, UNC, 5, 6, 12 y 13 de junio y 31 de julio de 2015. Duración: 20 h.
- "*Fundamentos Didácticos y Pedagógicos en la enseñanza de la Química*". Organizado por Facultad de Ciencias Químicas, UNC, del 5 de agosto al 11 de noviembre de 2015. Duración: 45 h. Curso general obligatorio de la carrera de Doctorado.
- "*Aplicaciones Biomédicas de la Inmunofluorescencia: Diagnóstico e Investigación*". Organizado por el Instituto de Virología "Dr. J.M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, UNC, desde 10 al 14 de agosto 2015. Duración: 20 h.
- "*Universidad, ciencia y sociedad*". Organizado por el Departamento de Bioquímica Clínica de la FCQ (UNC) y Consejo Asesor de Doctorado y Maestría (CADYM), Facultad de Ciencias Químicas, UNC. Duración: 21 h.
- "*Análisis Multivariado*" Organizado por el Departamento de Físicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC. Duración: 36 h.
- "*Innate Immunity*" Organizado por L' Institute Pasteur, París Francia.
- "*Biología de células presentadoras de antígenos*" Organizado por el Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC-2017. Duración: 21 h.

- “Aplicaciones Avanzadas de la Citometría de Flujo en el Estudio de Sistemas Biológicos” Organizado por el Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos - UNLP - CONICET - Facultad de Ciencias Exactas - La Plata- 2018. Duración: 30 h.

Presentaciones en congresos y conferencias

- “*Immune repertoire and disease signature changes in primary Sjögren's syndrome patients after VAY736 treatment*” **Eberhardt, N**; Frova-Seguin, A; Peters, T. Next Generation Scientist day 2019, Basilea, Suiza.
- “*Differential localization of CD73 in target tissues of Trypanosoma cruzi infection and the effect of this adenosine generating ectoenzyme on local parasite replication*” Bergero, G; **Eberhardt, N**; Mazzocco, YL; Theumer, MG; Sanmarco, LM; Aoki, MP. LXVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología 2019, Tucumán-Argentina, 2019.
- “*El sistema purinérgico determina la respuesta anti-parasitaria en la cardiomiopatía chagásica*” Bergero, G; **Eberhardt, N**; Sanmarco, LM; Aoki, MP. II Congreso Científico Profesional de Bioquímica, Córdoba-Argentina, 2019.
- “*Evaluation of the efficacy and safety of the combined treatment of benznidazole and clomipramine in controlled release systems in the experimental Chagas disease*” García, MC, **Eberhardt, N**, Sanmarco, LM, Jimenez-Kairuz A, Aoki, MP- 50° Reunión Anual de la Asociación Argentina de Farmacología Experimental- 1° Reunión Conjunta SAFE RICIFA 2018, San Luis- Argentina, 2018.
- “*HIF-1 α /purinergic axis is altered in patients with chronic Chagas disease*” **Eberhardt, N**; Sanmarco, LM; Bergero, G; Visconti, LM; Minguez, AR; Vigliano, CA; Aoki, MP. Reunión Conjunta SAIC SAI SAFIS 2018, Mar del Plata-Argentina, 2018.
- “*Purinergic signaling differentially modulates tissue immune response fate in experimental Chagas disease*” **Eberhardt N**; Sanmarco LM; Theumer MG; García MC; Ponce NE; Aoki MP. Presentado en Purines 2018 International Congress- Basic and translational science on purinergic signaling and its components for a healthy and better world- Foz de Iguaçu- Paraná, Brasil, 2018.
- “*Las vías de señalización purinérgicas modulan diferencialmente la respuesta inmune a Trypanosoma cruzi en los tejidos blanco de la infección*” **Eberhardt N**; Sanmarco LM; Bergero G; Theumer MG; García MC; Ponce NE; Aoki MP. Presentado en las VIII Jornadas de Posgrado y II Jornadas de Ciencia y Tecnología, Córdoba- Argentina, 2018.
- “*Oxidative stress induced by glycolysis drives the crosstalk between monocytes and T cells in human Chagas disease*” Sanmarco ML; **Eberhardt N**; Quebrada Palacio LP; Martino Adami P; Visconti L; Minguez AR; Morelli L; Postan M; Aoki MP. Presentado en XII Congress of the Latin American Association of Immunology- ALAI/ XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology-SMI, Cancún- Quintana Roo, México, 2018.

- *"Modulation of purinergic signaling has a tissue-dependent impact on the immune response against trypanosoma cruzi infection"* **Eberhardt N**; Sanmarco LM; García MC; Ponce NE; Theumer MG; Aoki MP. Presentado en la Reunión conjunta de sociedades en biosciencias- LXV Reunión anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, Buenos Aires- Argentina, 2017.
- *"Monocytes from chagasic patients are hyperinflammatory: Characterization of hypoxia response pathways in different monocyte subsets"* Sanmarco, LM; Visconti, ML, **Eberhardt, N**; Ponce, NE; Ramello, MC; Elizondo, DF; Minguez, AR; Aoki, MP. Presentado el Keystone Symposia Conference- Mononuclear Phagocytes in Health, Immune Defense and Disease, Texas- USA, 2017.
- *"IL-6 regulates insulin resistance and cardiovascular disease during Trypanosoma cruzi experimental infection"* Sanmarco LM; **Eberhardt N**; Ponce NE; Bergero G; Vigliano C; Cano RC; Aoki MP. Presentado en la Reunión conjunta de sociedades en biosciencias- LXV Reunión anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, Buenos Aires- Argentina, 2017.
- *"Chagas disease in an obesogenic context: a highlight role for visceral adipose tissue as a chronic reservoir of Trypanosoma cruzi that contributes to associated cardiovascular complications"* Cabalén ME; Sanmarco LM; **Eberhardt N**; Cabral MF; Andrada MC; Ponce NE; Gea S; Aoki MP; Cano RC. Presentado en la Reunión conjunta de sociedades en biosciencias- LXV Reunión anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, Buenos Aires- Argentina, 2017.
- *"Benznidazole-loaded multiparticulate drug delivery systems improve experimental Chagas disease pharmacotherapy"* García MC; **Eberhardt N**; Sanmarco LM; Ponce NE; Jimenez-Kairuz A; Aoki MP. Presentado en la Reunión conjunta de sociedades en biosciencias- LXV Reunión anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, Buenos Aires- Argentina, 2017.
- *"Purinergic signaling differentially regulates the immune response in Trypanosoma cruzi target tissues"* **Eberhardt, N**; Ponce, NE; Sanmarco, LM; Aoki, MP. LXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, Mar del Plata, 16 al 19 de noviembre de 2016.
- *"Monocytes from chagasic patients are hyperinflammatory: expression of ATP metabolic machinery in different monocyte subpopulations"* Sanmarco, LM; Visconti, LM; Ponce, NE; **Eberhardt, N**; Ramello, MC; Elizondo, D; Voza, L; Spitale, NB; Bernardi, GA; Minguez, RA; Aoki MP. LXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, Mar del Plata, 16 al 19 de noviembre de 2016.
- *"IL-6 dirige el fenotipo de macrófagos cardíacos y regula la liberación letal de óxido nítrico mediante la inhibición de IL-1B durante la infección con Trypanosoma cruzi"* Sanmarco, LM; Ponce, NE; Visconti, LM; **Eberhardt, N**; Theumer, MG; Minguez, RA; Aoki MP. I Congreso Científico Profesional de Bioquímica, Córdoba, 05 al 08 de octubre de 2016.
- *"Determinación del grado de miocarditis y expresión de HIF-1a en células infiltrantes cardíacas en pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica"* **Eberhardt, N**; Ponce, NE; Sanmarco, LM; Aoki, MP. I Congreso

Científico Profesional de Bioquímica. Córdoba, 05 al 08 de octubre de 2016.

- *"IL-6 frena la disfunción de células T CD8+ inducida por óxido nítrico en enfermedad de chagas humana"* Sanmarco, LM; Visconti, LM; **Eberhardt, N**; Ramello, MC; Ponce, NE; Elizondo, D; Spitale, NB; Vozza, L; Bernardi, GA; Gea, S; Minguez, RA; Aoki MP. I Congreso Científico Profesional de Bioquímica. Córdoba, 05 al 08 de octubre de 2016. **Mención especial en el área de Inmunología.**
- *"Characterization of the role of adenosine in modulating cardiac immune response to Trypanosoma cruzi infection"* **Eberhardt, N**; Ponce, NE; Sanmarco, LM; Aoki, MP. VII Jornadas de Posgrado y I Jornadas de Ciencias y Tecnología. Córdoba, 06 al 08 de Abril de 2016.
- *"IL-6 Determines alternative activation of cardiac macrophages and regulates the lethal release of nitric oxide through IL-1 β inhibition during experimental Trypanosoma cruzi infection"*. Sanmarco, LM; Ponce, NE; Visconti, LM; **Eberhardt, N**; Theumer, MG; Minguez, AR; Aoki, MP. VII Jornadas de Posgrado y I Jornadas de Ciencias y Tecnología, Córdoba, 06 al 08 de abril de 2016.
- *"IL-6 drives cardiac macrophage profile and regulates the lethal release of Nitric Oxide production through IL-1 β inhibition during parasite infection"*. Sanmarco, LM; Ponce, NE; Visconti, LM; **Eberhardt, N**; Spitale, NB; Bernardi, GA; Minguez, RA; Aoki MP. LXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, Buenos Aires, 18 al 21 de noviembre de 2015.
- *"Adenosine-derived from CD73 enzymatic activity modulates the activation status of cardiac macrophages during experimental Trypanosoma cruzi infection"* **Eberhardt, N**; Ponce, NE; Sanmarco, LM; Aoki, MP. Seleccionado para presentación oral. LXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología Buenos Aires, 18 al 21 de noviembre de 2015.

Menciones de honor y premios

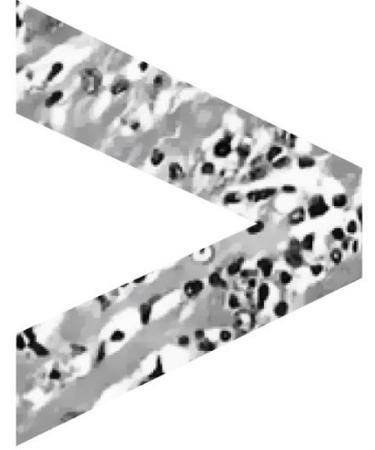
- Premio *"Cesar Milstein"* en la temática: *"Perspectivas actuales sobre los mecanismos y / o terapias de la enfermedad de Chagas"* en la reunión conjunta SAIC SAI SAFIS 2018, Mar del Plata-Argentina. Trabajo presentado: *"HIF-1 α /purinergic axis is altered in patients with chronic Chagas disease"* **Eberhardt, N**; Sanmarco, LM; Bergero, G; Visconti, LM; Minguez, AR; Vigliano, CA; Aoki, MP. Otorgado por Instituto Novartis de Investigación Biomédica y Novartis Argentina SA, Sociedad Argentina de Inmunología (SAI), Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y Sociedad de Fisiología (SAFIS).
- Mención de honor *"Pedro Muanis Persechini"* en la presentación de poster *"Purinergic signaling differentially modulates tissue immune response fate in experimental Chagas disease"* **Eberhardt, N**; Sanmarco, LM; Theumer, MG; García, MC; Ponce, NE; Aoki, MP en el Congreso Purines 2018 llevada a cabo desde el 19 al 22 de junio de 2018 en Foz de Iguazú, Brasil.
- Mención de honor a la presentación oral *"IL-6 frena la disfunción de células T CD8+ inducida por óxido nítrico en enfermedad de chagas humana"* Sanmarco, LM; Visconti, LM; **Eberhardt, N**; Ramello, MC;

Ponce, NE; Elizondo, D; Spitale, NB; Voza, L; Bernardi, GA; Gea, S; Minguez, RA; Aoki MP en el 1° Congreso Científico Profesional de Bioquímica 2018, Córdoba, Argentina.

- Premio SAFE por la presentación oral del trabajo: "*Evaluation of the efficacy and safety of the combined treatment of benznidazole and clomipramine in controlled release systems in the experimental Chagas disease*" García, MC, **Eberhardt, N**, Sanmarco, LM, Jimenez-Kairuz A, Aoki, MP en la reunión conjunta SAFE RICIFA 2018 in San Luis, Argentina.

Pasantía

- Pasantía de 3 meses en Novartis, Suiza para participar del programa "*Next Generation Scientist 2019*". Desarrollo del proyecto de investigación denominado: "*Investigating immune repertoire changes in primary Sjögren's Syndrome by Next Generation Sequencing*" bajo la dirección del mentor Thomas Peters perteneciente al Departamento de Desarrollo de Biomarcadores, Genética y Genómica, Medicina Translacional, Instituto de Novartis de Investigación Biomédica, Novartis, Suiza. Capacitación en técnicas de biología molecular y *sequencing* de última generación, en las temáticas de aptitudes de liderazgo, habilidades de comunicación y desarrollo de ensayos clínico.



BIBLIOGRAFÍA

Caracterización del rol de adenosina en la respuesta inmune cardíaca a la infección por *Trypanosoma cruzi* y efecto de su manipulación en la progresión de la miocardiopatía chagásica.

- [1] World Health Organization, WHO Fact Sheet No. 340., (2016).
- [2] S. Sosa-Estani, R. Viotti, E.L. Segura, Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1 (2009) 167-180. doi: 10.1590/s0074-02762009000900023
- [3] M.J. Pinazo, J. Gascon, The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health), *Acta tropica*, 151 (2015) 16-20. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.06.013
- [4] O.P.D.L. Salud, Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Americas., Organización Panamericana de la Salud, Montevideo, Uruguay, (2006).
- [5] R.E. Gurtler, E.L. Segura, J.E. Cohen, Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina, *Emerging infectious diseases*, 9 (2003) 29-32. doi: 10.3201/eid0901.020274
- [6] J. Gascon, P. Grupo de Trabajo del Taller Enfermedad de Chagas Importada: Un Nuevo Reto de Salud, [Diagnosis and treatment of imported Chagas disease], *Medicina clinica*, 125 (2005) 230-235. doi: 10.1157/13077386
- [7] World Health Organization- Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases, (2015).
- [8] A. Rassi, Jr., A. Rassi, J. Marcondes de Rezende, American trypanosomiasis (Chagas disease), *Infectious disease clinics of North America*, 26 (2012) 275-291. doi: 10.1016/j.idc.2012.03.002
- [9] G.A. Schmunis, Z.E. Yadon, Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem, *Acta tropica*, 115 (2010) 14-21. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.11.003
- [10] G.A. Schmunis, Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102 Suppl 1 (2007) 75-85. doi: 10.1590/s0074-02762007005000093
- [11] E.E. Conners, J.M. Vinetz, J.R. Weeks, K.C. Brouwer, A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants, *Acta tropica*, 156 (2016) 68-78. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.01.002
- [12] J. Gascon, C. Bern, M.J. Pinazo, Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries, *Acta tropica*, 115 (2010) 22-27. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.07.019
- [13] Y. Jackson, A. Pinto, S. Pett, Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions, *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 19 (2014) 212-218. doi: 10.1111/tmi.12235
- [14] J.R. Coura, P.A. Vinas, Chagas disease: a new worldwide challenge, *Nature*, 465 (2010) S6-7. doi: 10.1038/nature09221
- [15] R.E. Gurtler, M.C. Cecere, M.A. Lauricella, M.V. Cardinal, U. Kitron, J.E. Cohen, Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina, *Parasitology*, 134 (2007) 69-82. doi: 10.1017/S0031182006001259
- [16] F. Noireau, P. Diosque, A.M. Jansen, *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts, *Veterinary research*, 40 (2009) 26. doi: 10.1051/vetres/2009009

- [17] P. J.S., American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research. London: Elsevier, Chapter 5: Distribution of Chagas Disease, (2010).
- [18] F.J. Carod-Artal, American trypanosomiasis, Handbook of clinical neurology, 114 (2013) 103-123. doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00007-8
- [19] J.R. Coura, J. Borges-Pereira, Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review, Acta tropica, 115 (2010) 5-13. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.03.008
- [20] C. Bern, Chagas' Disease, The New England journal of medicine, 373 (2015) 456-466. doi: 10.1056/NEJMra1410150
- [21] Martins, André Vianna, Gomes, Andréia Patrícia, Gomes de Mendonça, Eduardo, Lopes Rangel Fietto, Juliana, Santana, Luiz Alberto, de Almeida Oliveira, Maria Goreti, Geller, Mauro, de Freitas Santos, Ramon, Roger Vitorino, Rodrigo, & Siqueira-Batista, Rodrigo. (2012). Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. Infectio, 16(1), 45-58.
- [22] J.C. Carranza, H.M. Valadares, D.A. D'Avila, R.P. Baptista, M. Moreno, L.M. Galvao, E. Chiari, N.R. Sturm, E.D. Gontijo, A.M. Macedo, B. Zingales, *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil, International journal for parasitology, 39 (2009) 963-973. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.01.009
- [23] B. Zingales, S.G. Andrade, M.R. Briones, D.A. Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, A.M. Macedo, C.R. Machado, M.A. Miles, A.J. Romanha, N.R. Sturm, M. Tibayrenc, A.G. Schijman, M. Second Satellite, A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI, Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 104 (2009) 1051-1054. doi: 10.1590/s0074-02762009000700021
- [24] B. Zingales, M.A. Miles, D.A. Campbell, M. Tibayrenc, A.M. Macedo, M.M. Teixeira, A.G. Schijman, M.S. Llewellyn, E. Lages-Silva, C.R. Machado, S.G. Andrade, N.R. Sturm, The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications, Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 12 (2012) 240-253. doi: 10.1016/j.meegid.2011.12.009
- [25] L.A. Messenger, M.A. Miles, C. Bern, Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease, Expert review of anti-infective therapy, 13 (2015) 995-1029. doi: 10.1586/14787210.2015.1056158
- [26] B. Zingales, *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity, Acta tropica, 184 (2018) 38-52. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.09.017
- [27] J.R. Coura, The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review, Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 110 (2015) 277-282. doi: 10.1590/0074-0276140362
- [28] M.T. Filigheddu, M. Gorgolas, J.M. Ramos, Orally-transmitted Chagas disease, Medicina clinica, 148 (2017) 125-131. doi: 10.1016/j.medcli.2016.10.038
- [29] J.A. Perez-Molina, I. Molina, Chagas disease, Lancet, 391 (2018) 82-94. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4

- [30] L.E. Echeverria, C.A. Morillo, American Trypanosomiasis (Chagas Disease), *Infectious disease clinics of North America*, 33 (2019) 119-134. doi: 10.1016/j.idc.2018.10.015
- [31] A. Prata, Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease, *The Lancet. Infectious diseases*, 1 (2001) 92-100. doi: 10.1016/S1473-3099(01)00065-2
- [32] H.A. Carrasco, J.S. Barboza, G. Inglessis, A. Fuenmayor, C. Molina, Left ventricular cineangiography in Chagas' disease: detection of early myocardial damage, *American heart journal*, 104 (1982) 595-602.
- [33] A. Rassi, Jr., A. Rassi, J.A. Marin-Neto, Chagas disease, *Lancet*, 375 (2010) 1388-1402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X
- [34] L.V. Kirchoff, American trypanosomiasis (Chagas' disease), *Gastroenterology clinics of North America*, 25 (1996) 517-533.
- [35] N.M. Matsuda, S.M. Miller, P.R. Evora, The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease, *Clinics*, 64 (2009) 1219-1224. doi: 10.1590/S1807-59322009001200013
- [36] A. Hidron, N. Vogenthaler, J.I. Santos-Preciado, A.J. Rodriguez-Morales, C. Franco-Paredes, A. Rassi, Jr., Cardiac involvement with parasitic infections, *Clinical microbiology reviews*, 23 (2010) 324-349. doi: 10.1128/CMR.00054-09
- [37] L.H. Malik, G.D. Singh, E.A. Amsterdam, Chagas Heart Disease: An Update, *The American journal of medicine*, 128 (2015) 1251 e1257-1259. doi: 10.1016/j.amjmed.2015.04.036
- [38] E.A. Bocchi, R.B. Bestetti, M.I. Scanavacca, E. Cunha Neto, V.S. Issa, Chronic Chagas Heart Disease Management: From Etiology to Cardiomyopathy Treatment, *Journal of the American College of Cardiology*, 70 (2017) 1510-1524. doi: 10.1016/j.jacc.2017.08.004
- [39] A. Rassi, Jr., A. Rassi, W.C. Little, S.S. Xavier, S.G. Rassi, A.G. Rassi, G.G. Rassi, A. Hasslocher-Moreno, A.S. Sousa, M.I. Scanavacca, Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease, *The New England journal of medicine*, 355 (2006) 799-808. doi: 10.1056/NEJMoa053241
- [40] R.L. Tarleton, Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease, *International journal for parasitology*, 31 (2001) 550-554. doi: 10.1016/s0020-7519(01)00158-8
- [41] F.S. Machado, W.O. Dutra, L. Esper, K.J. Gollob, M.M. Teixeira, S.M. Factor, L.M. Weiss, F. Nagajyothi, H.B. Tanowitz, N.J. Garg, Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease, *Seminars in immunopathology*, 34 (2012) 753-770. doi: 10.1007/s00281-012-0351-7
- [42] F. Nagajyothi, M.S. Desruisseaux, L.M. Weiss, S. Chua, C. Albanese, F.S. Machado, L. Esper, M.P. Lisanti, M.M. Teixeira, P.E. Scherer, H.B. Tanowitz, Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1 (2009) 219-225. doi: 10.1590/s0074-02762009000900028
- [43] M.J. Pinazo, G. Espinosa, C. Cortes-Lletget, J. Posada Ede, E. Aldasoro, I. Oliveira, J. Munoz, M. Gallego, J. Gascon, Immunosuppression and Chagas disease: a management challenge, *PLoS neglected tropical diseases*, 7 (2013) e1965. doi: 10.1371/journal.pntd.0001965
- [44] C.J. Perez, A.J. Lymbery, R.C.A. Thompson, Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health, *Trends in parasitology*, 31 (2015) 595-603. doi: 10.1016/j.pt.2015.06.006

- [45] A.M. Feldman, D. McNamara, Myocarditis, *The New England journal of medicine*, 343 (2000) 1388-1398. doi: 10.1056/NEJM200011093431908
- [46] E. Cunha-Neto, C. Chevillard, Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics, *Mediators of inflammation*, 2014 (2014) 683230. doi: 10.1155/2014/683230
- [47] A. Rassi, Jr., S.G. Rassi, A. Rassi, Sudden death in Chagas' disease, *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 76 (2001) 75-96. doi: 10.1590/s0066-782x2001000100008
- [48] A. Rassi, Jr., A. Rassi, S.G. Rassi, Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies, *Circulation*, 115 (2007) 1101-1108. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.627265
- [49] C.W. Yancy, M. Jessup, B. Bozkurt, J. Butler, D.E. Casey, Jr., M.H. Drazner, G.C. Fonarow, S.A. Geraci, T. Horwich, J.L. Januzzi, M.R. Johnson, E.K. Kasper, W.C. Levy, F.A. Masoudi, P.E. McBride, J.J. McMurray, J.E. Mitchell, P.N. Peterson, B. Riegel, F. Sam, L.W. Stevenson, W.H. Tang, E.J. Tsai, B.L. Wilkoff, 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines, *Circulation*, 128 (2013) 1810-1852. doi: 10.1161/CIR.0b013e31829e8807
- [50] J.A. Marin-Neto, E. Cunha-Neto, B.C. Maciel, M.V. Simoes, Pathogenesis of chronic Chagas heart disease, *Circulation*, 115 (2007) 1109-1123. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296
- [51] J.D. Maya, M. Orellana, J. Ferreira, U. Kemmerling, R. Lopez-Munoz, A. Morello, Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy, *Biological research*, 43 (2010) 323-331. doi: /S0716-97602010000300009
- [52] A. Flavia Nardy, C.G. Freire-de-Lima, A. Morrot, Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*, *Journal of immunology research*, 2015 (2015) 178947. doi: 10.1155/2015/178947
- [53] K.M. Bonney, D.M. Engman, Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead, *The American journal of pathology*, 185 (2015) 1537-1547. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.12.023
- [54] F. Kierszenbaum, Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis, *Clinical microbiology reviews*, 12 (1999) 210-223.
- [55] F. Kierszenbaum, Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease?, *Trends in parasitology*, 21 (2005) 513-516. doi: 10.1016/j.pt.2005.08.013
- [56] R.L. Tarleton, L. Zhang, Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?, *Parasitology today*, 15 (1999) 94-99. doi: 10.1016/s0169-4758(99)01398-8
- [57] N. Girones, M. Fresno, Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both?, *Trends in parasitology*, 19 (2003) 19-22.
- [58] E. De Bona, K.C.F. Lidani, L. Bavia, Z. Omidian, L.H. Gremski, T.L. Sandri, I.J. de Messias Reason, Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy?, *Frontiers in immunology*, 9 (2018) 1842. doi: 10.3389/fimmu.2018.01842

- [59] E. Cunha-Neto, P.C. Teixeira, L.G. Nogueira, J. Kalil, Autoimmunity, *Advances in parasitology*, 76 (2011) 129-152. doi: 10.1016/B978-0-12-385895-5.00006-2
- [60] E. Cunha-Neto, V. Coelho, L. Guilherme, A. Fiorelli, N. Stolf, J. Kalil, Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient, *The Journal of clinical investigation*, 98 (1996) 1709-1712. doi: 10.1172/JCI118969
- [61] Rodolfo A Kölliker-Frers, Matilde Otero-Losada, Gabriela Razzitte, Mariela Calvo, Justo Carbajales and Francisco Capani (September 12th 2018). Chagas Cardiomyopathy: Role of Sustained Host-Parasite Interaction in Systemic Inflammatory Burden, *Chagas Disease - Basic Investigations and Challenges*, Veeranoot Nissapatorn and Helieh S. Oz, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.77980.
- [62] F.R. Gutierrez, P.M. Guedes, R.T. Gazzinelli, J.S. Silva, The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease, *Parasite immunology*, 31 (2009) 673-685. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01108.x
- [63] L. Zhang, R.L. Tarleton, Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease, *The Journal of infectious diseases*, 180 (1999) 480-486. doi: 10.1086/314889
- [64] L. Higuchi Mde, T. De Brito, M. Martins Reis, A. Barbosa, G. Bellotti, A.C. Pereira-Barreto, F. Pileggi, Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings, *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 2 (1993) 101-106. doi: 10.1016/1054-8807(93)90021-S
- [65] G. Bellotti, E.A. Bocchi, A.V. de Moraes, M.L. Higuchi, M. Barbero-Marcial, E. Sosa, A. Esteves-Filho, R. Kalil, R. Weiss, A. Jatene, F. Pileggi, In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease, *American heart journal*, 131 (1996) 301-307. doi: 10.1016/s0002-8703(96)90358-0
- [66] A.G. Schijman, C.A. Vigliano, R.J. Viotti, J.M. Burgos, S. Brandariz, B.E. Lococo, M.I. Leze, H.A. Armenti, M.J. Levin, *Trypanosoma cruzi* DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic chagas heart disease, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70 (2004) 210-220.
- [67] J.M. Burgos, M. Diez, C. Vigliano, M. Bisio, M. Risso, T. Duffy, C. Cura, B. Brusses, L. Favalaro, M.S. Leguizamon, R.H. Lucero, R. Laguens, M.J. Levin, R. Favalaro, A.G. Schijman, Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 51 (2010) 485-495. doi: 10.1086/655680
- [68] M.D. Higuchi, M.M. Ries, V.D. Aiello, L.A. Benvenuti, P.S. Gutierrez, G. Bellotti, F. Pileggi, Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 56 (1997) 485-489. doi: 10.4269/ajtmh.1997.56.485

- [69] R. Viotti, C. Vigliano, B. Lococo, G. Bertocchi, M. Petti, M.G. Alvarez, M. Postan, A. Armenti, Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial, *Annals of internal medicine*, 144 (2006) 724-734. doi: 10.7326/0003-4819-144-10-200605160-00006
- [70] M.S. Ferreira, Chagas disease and immunosuppression, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1 (1999) 325-327. doi: 10.1590/s0074-02761999000700062
- [71] F. Salvador, A. Sanchez-Montalva, L. Valerio, N. Serre, S. Roure, B. Trevino, D. Pou, E. Sulleiro, C. Bocanegra, I. Molina, Immunosuppression and Chagas disease; experience from a non-endemic country, *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21 (2015) 854-860. doi: 10.1016/j.cmi.2015.05.033
- [72] E.A. Bocchi, A. Fiorelli, C. First Guideline Group for Heart Transplantation of the Brazilian Society of, The Brazilian experience with heart transplantation: a multicenter report, *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 20 (2001) 637-645. doi: 10.1016/s1053-2498(00)00235-7
- [73] R. Favaloro, M. Peradejordi, A. Bertolotti, M. Diez, L. Favaloro, C. Gomez, L. Martinez, S. Moscoloni, Results of heart transplantation: 16 years' experience in a center in Argentina, *Transplantation proceedings*, 42 (2010) 321-323. doi: 10.1016/j.transproceed.2009.12.005
- [74] G.E. Gondolesi, L. Bisigniano, A. Bertolotti, P.B. Schelotto, P. Raffaele, Organ Transplantation in Argentina, *Transplantation*, 102 (2018) 883-886. doi: 10.1097/TP.0000000000002172
- [75] Strout RG. A method for concentrating hemoflagellates. *J Parasitol* 1962; 48: 100.
- [76] A.G. Schijman, C. Vigliano, J. Burgos, R. Favaloro, S. Perrone, R. Laguens, M.J. Levin, Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient, *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 19 (2000) 1114-1117. doi: 10.1016/s1053-2498(00)00168-6
- [77] M. Diez, L. Favaloro, A. Bertolotti, J.M. Burgos, C. Vigliano, M.P. Lastra, M.J. Levin, A. Arnedo, C. Nagel, A.G. Schijman, R.R. Favaloro, Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation, *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 7 (2007) 1633-1640. doi: 10.1111/j.1600-6143.2007.01820.x
- [78] E.P. Kransdorf, P.C. Zakowski, J.A. Kobashigawa, Chagas disease in solid organ and heart transplantation, *Current opinion in infectious diseases*, 27 (2014) 418-424. doi: 10.1097/QCO.0000000000000088
- [79] N.D. Bertolino, D.F. Villafanha, A. Cardinali-Neto, J.A. Cordeiro, M.J. Arcanjo, T.A. Theodoropoulos, R.B. Bestetti, Prognostic impact of Chagas' disease in patients awaiting heart transplantation, *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication*

- of the International Society for Heart Transplantation, 29 (2010) 449-453. doi: 10.1016/j.healun.2009.10.014
- [80] C. Junqueira, B. Caetano, D.C. Bartholomeu, M.B. Melo, C. Ropert, M.M. Rodrigues, R.T. Gazzinelli, The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease, *Expert reviews in molecular medicine*, 12 (2010) e29. doi: 10.1017/S1462399410001560
- [81] F. Cardillo, R.T. de Pinho, P.R. Antas, J. Mengel, Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection, *Pathogens and disease*, 73 (2015) ftv082. doi: 10.1093/femspd/ftv082
- [82] F.S. Machado, K.M. Tyler, F. Brant, L. Esper, M.M. Teixeira, H.B. Tanowitz, Pathogenesis of Chagas disease: time to move on, *Frontiers in bioscience*, 4 (2012) 1743-1758.
- [83] H.B. Tanowitz, L.V. Kirchoff, D. Simon, S.A. Morris, L.M. Weiss, M. Wittner, Chagas' disease, *Clin Microbiol Rev*, 5 (1992) 400-419.
- [84] Viotti, Rodolfo J.; Vigliano Carlos A. Enfermedad de Chagas: Un enfoque práctico basado en la investigación médica (1st ed.). Buenos Aires, Argentina. Medica Panamericana., (2015).
- [85] S. Gordon, P.R. Taylor, Monocyte and macrophage heterogeneity, *Nature reviews. Immunology*, 5 (2005) 953-964. doi: 10.1038/nri1733
- [86] L.M. Sanmarco, N. Eberhardt, N.E. Ponce, R.C. Cano, G. Bonacci, M.P. Aoki, New Insights into the Immunobiology of Mononuclear Phagocytic Cells and Their Relevance to the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases, *Frontiers in immunology*, 8 (2017) 1921. doi: 10.3389/fimmu.2017.01921
- [87] F. Geissmann, M.G. Manz, S. Jung, M.H. Sieweke, M. Merad, K. Ley, Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells, *Science*, 327 (2010) 656-661. doi: 10.1126/science.1178331
- [88] F. Leuschner, P.J. Rauch, T. Ueno, R. Gorbato, B. Marinelli, W.W. Lee, P. Dutta, Y. Wei, C. Robbins, Y. Iwamoto, B. Sena, A. Chudnovskiy, P. Panizzi, E. Keliher, J.M. Higgins, P. Libby, M.A. Moskowitz, M.J. Pittet, F.K. Swirski, R. Weissleder, M. Nahrendorf, Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis, *The Journal of experimental medicine*, 209 (2012) 123-137. doi: 10.1084/jem.20111009
- [89] I. Hilgendorf, F.K. Swirski, Making a difference: monocyte heterogeneity in cardiovascular disease, *Current atherosclerosis reports*, 14 (2012) 450-459. doi: 10.1007/s11883-012-0274-8
- [90] K. Mizuno, T. Toma, H. Tsukiji, H. Okamoto, H. Yamazaki, K. Ohta, K. Ohta, Y. Kasahara, S. Koizumi, A. Yachie, Selective expansion of CD16^{high}CCR2⁻ subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation, *Clinical and experimental immunology*, 142 (2005) 461-470. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02932.x
- [91] G. Fingerle-Rowson, J. Auers, E. Kreuzer, P. Fraunberger, M. Blumenstein, L.H. Ziegler-Heitbrock, Expansion of CD14⁺CD16⁺ monocytes in critically ill cardiac surgery patients, *Inflammation*, 22 (1998) 367-379. doi: 10.1023/a:1022316815196

- [92] A. Horelt, K.U. Belge, B. Steppich, J. Prinz, L. Ziegler-Heitbrock, The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production, *European journal of immunology*, 32 (2002) 1319-1327. doi: 10.1002/1521-4141(200205)32:5<1319::AID-IMMU1319>3.0.CO;2-2
- [93] S.J. Koo, I.H. Chowdhury, B. Szczesny, X. Wan, N.J. Garg, Macrophages Promote Oxidative Metabolism To Drive Nitric Oxide Generation in Response to *Trypanosoma cruzi*, *Infection and immunity*, 84 (2016) 3527-3541. doi: 10.1128/IAI.00809-16
- [94] D.M. Mosser, J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation, *Nature reviews. Immunology*, 8 (2008) 958-969. doi: 10.1038/nri2448
- [95] S. Zhang, C.C. Kim, S. Batra, J.H. McKerrow, P. Loke, Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines, *PLoS neglected tropical diseases*, 4 (2010) e648. doi: 10.1371/journal.pntd.0000648
- [96] F. Cardillo, J.C. Voltarelli, S.G. Reed, J.S. Silva, Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells, *Infection and immunity*, 64 (1996) 128-134.
- [97] M.I. Antunez, R.L. Cardoni, IL-12 and IFN-gamma production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections, *Immunology letters*, 71 (2000) 103-109. doi: 10.1016/s0165-2478(99)00172-8
- [98] J.E. Lykens, C.E. Terrell, E.E. Zoller, S. Divanovic, A. Trompette, C.L. Karp, J. Aliberti, M.J. Flick, M.B. Jordan, Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo, *Journal of immunology*, 184 (2010) 877-885. doi: 10.4049/jimmunol.0902346
- [99] A.K. Abbas, A.H.H. Lichtman, S. Pillai, *Inmunología celular y molecular Elsevier Health Sciences Spain*, 2015.
- [100] R.L. Tarleton, Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*, *Current opinion in immunology*, 19 (2007) 430-434. doi: 10.1016/j.coi.2007.06.003
- [101] J.M. Coquet, L. Rausch, J. Borst, The importance of co-stimulation in the orchestration of T helper cell differentiation, *Immunology and cell biology*, 93 (2015) 780-788. doi: 10.1038/icb.2015.45
- [102] L. Zhou, M.M. Chong, D.R. Littman, Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation, *Immunity*, 30 (2009) 646-655. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.001
- [103] Owen, J. A., Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P., & Kuby, J. (2013). *Kuby immunology*. New York: W.H. Freeman.
- [104] Fainboim, L., & Geffner, J. (2005). *Introducción a la inmunología humana*. Buenos Aires: Editoria Medica Panamericana.
- [105] J. Zhu, H. Yamane, W.E. Paul, Differentiation of effector CD4 T cell populations (*), *Annual review of immunology*, 28 (2010) 445-489. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212

- [106] R.L. Tarleton, The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections, *Parasitology today*, 11 (1995) 7-9. doi: 10.1016/0169-4758(95)80095-6
- [107] R.L. Tarleton, CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection, *Seminars in immunopathology*, 37 (2015) 233-238. doi: 10.1007/s00281-015-0481-9
- [108] E.J. Wherry, T cell exhaustion, *Nature immunology*, 12 (2011) 492-499.
- [109] R.J. Arguello, C. Vigliano, P. Cabeza-Meckert, R. Viotti, F. Garelli, L.E. Favaloro, R.R. Favaloro, R. Laguens, S.A. Laucella, Presence of antigen-experienced T cells with low grade of differentiation and proliferative potential in chronic Chagas disease myocarditis, *PLoS neglected tropical diseases*, 8 (2014) e2989. doi: 10.1371/journal.pntd.0002989
- [110] Z. Brener, R.T. Gazzinelli, Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease, *International archives of allergy and immunology*, 114 (1997) 103-110.
- [111] J.R. Cancado, Etiological treatment of chronic Chagas disease, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 43 (2001) 173-181. doi: 10.1590/s0036-46652001000300012
- [112] S. Garcia, C.O. Ramos, J.F. Senra, F. Vilas-Boas, M.M. Rodrigues, A.C. Campos-de-Carvalho, R. Ribeiro-Dos-Santos, M.B. Soares, Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49 (2005) 1521-1528. doi: 10.1128/AAC.49.4.1521-1528.2005
- [113] C.A. Morillo, J.A. Marin-Neto, A. Avezum, S. Sosa-Estani, A. Rassi, Jr., F. Rosas, E. Villena, R. Quiroz, R. Bonilla, C. Britto, F. Guhl, E. Velazquez, L. Bonilla, B. Meeks, P. Rao-Melacini, J. Pogue, A. Mattos, J. Lazdins, A. Rassi, S.J. Connolly, S. Yusuf, B. Investigators, Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy, *The New England journal of medicine*, 373 (2015) 1295-1306. doi: 10.1056/NEJMoa1507574
- [114] R. Viotti, C. Vigliano, Etiological treatment of chronic Chagas disease: neglected 'evidence' by evidence-based medicine, *Expert review of anti-infective therapy*, 5 (2007) 717-726. doi: 10.1586/14787210.5.4.717
- [115] E. Pinheiro, L. Brum-Soares, R. Reis, J.C. Cubides, Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50 (2017) 296-300. doi: 10.1590/0037-8682-0433-2016
- [116] E. Chatelain, Chagas disease drug discovery: toward a new era, *Journal of biomolecular screening*, 20 (2015) 22-35. doi: 10.1177/1087057114550585
- [117] L.G. Ferreira, M.T. de Oliveira, A.D. Andricopulo, Advances and Progress in Chagas Disease Drug Discovery, *Current topics in medicinal chemistry*, 16 (2016) 2290-2302. doi: 10.2174/1568026616666160413124902
- [118] J.M. Bustamante, R.L. Tarleton, Potential new clinical therapies for Chagas disease, *Expert review of clinical pharmacology*, 7 (2014) 317-325. doi: 10.1586/17512433.2014.909282
- [119] J. Bermudez, C. Davies, A. Simonazzi, J.P. Real, S. Palma, Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease, *Acta tropica*, 156 (2016) 1-16. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.12.017

- [120] F. Di Virgilio, M. Vuerich, Purinergic signaling in the immune system, *Autonomic neuroscience : basic & clinical*, 191 (2015) 117-123. doi: 10.1016/j.autneu.2015.04.011
- [121] M.R. Bono, D. Fernandez, F. Flores-Santibanez, M. Roseblatt, D. Sauma, CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression, *FEBS letters*, 589 (2015) 3454-3460. doi: 10.1016/j.febslet.2015.07.027
- [122] C. Cekic, J. Linden, Purinergic regulation of the immune system, *Nature reviews. Immunology*, 16 (2016) 177-192. doi: 10.1038/nri.2016.4
- [123] J. Sevigny, M. Martin-Satue, J. Pintor, Purinergic Signalling in Immune System Regulation in Health and Disease, *Mediators of inflammation*, 2015 (2015) 106863. doi: 10.1155/2015/106863
- [124] L. Antonioli, P. Pacher, E.S. Vizi, G. Hasko, CD39 and CD73 in immunity and inflammation, *Trends in molecular medicine*, 19 (2013) 355-367. doi: 10.1016/j.molmed.2013.03.005
- [125] L. Antonioli, C. Blandizzi, P. Pacher, G. Hasko, Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine, *Nature reviews. Cancer*, 13 (2013) 842-857. doi: 10.1038/nrc3613
- [126] R. Corriden, P.A. Insel, Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation, *Science signaling*, 3 (2010) re1. doi: 10.1126/scisignal.3104re1
- [127] S.C. Robson, J. Sevigny, H. Zimmermann, The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance, *Purinergic signalling*, 2 (2006) 409-430. doi: 10.1007/s11302-006-9003-5
- [128] H. Zimmermann, M. Zebisch, N. Strater, Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases, *Purinergic signalling*, 8 (2012) 437-502. doi: 10.1007/s11302-012-9309-4
- [129] S.P. Colgan, H.K. Eltzschig, T. Eckle, L.F. Thompson, Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73), *Purinergic signalling*, 2 (2006) 351-360. doi: 10.1007/s11302-005-5302-5
- [130] G.G. Yegutkin, Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade, *Biochimica et biophysica acta*, 1783 (2008) 673-694. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.024
- [131] B. Allard, M.S. Longhi, S.C. Robson, J. Stagg, The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets, *Immunological reviews*, 276 (2017) 121-144. doi: 10.1111/imr.12528
- [132] K. Dong, Z.W. Gao, H.Z. Zhang, The role of adenosinergic pathway in human autoimmune diseases, *Immunologic research*, 64 (2016) 1133-1141. doi: 10.1007/s12026-016-8870-2
- [133] F. Bonner, N. Borg, S. Burghoff, J. Schrader, Resident cardiac immune cells and expression of the ectonucleotidase enzymes CD39 and CD73 after ischemic injury, *PloS one*, 7 (2012) e34730. doi: 10.1371/journal.pone.0034730
- [134] A. Palazon, A.W. Goldrath, V. Nizet, R.S. Johnson, HIF transcription factors, inflammation, and immunity, *Immunity*, 41 (2014) 518-528. doi: 10.1016/j.immuni.2014.09.008

- [135] J.M. Poth, K. Brodsky, H. Ehrentraut, A. Grenz, H.K. Eltzschig, Transcriptional control of adenosine signaling by hypoxia-inducible transcription factors during ischemic or inflammatory disease, *Journal of molecular medicine*, 91 (2013) 183-193. doi: 10.1007/s00109-012-0988-7
- [136] K. Synnestvedt, G.T. Furuta, K.M. Comerford, N. Louis, J. Karhausen, H.K. Eltzschig, K.R. Hansen, L.F. Thompson, S.P. Colgan, Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia, *The Journal of clinical investigation*, 110 (2002) 993-1002. doi: 10.1172/JCI15337
- [137] J. Karhausen, G.T. Furuta, J.E. Tomaszewski, R.S. Johnson, S.P. Colgan, V.H. Haase, Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis, *The Journal of clinical investigation*, 114 (2004) 1098-1106. doi: 10.1172/JCI21086
- [138] T. Hagen, C.T. Taylor, F. Lam, S. Moncada, Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha, *Science*, 302 (2003) 1975-1978. doi: 10.1126/science.1088805
- [139] A.J. Harris, A.R. Thompson, M.K. Whyte, S.R. Walmsley, HIF-mediated innate immune responses: cell signaling and therapeutic implications, *Hypoxia*, 2 (2014) 47-58. doi: 10.2147/HP.S50269
- [140] W.G. Junger, Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling, *Nature reviews. Immunology*, 11 (2011) 201-212. doi: 10.1038/nri2938
- [141] T. Eckle, T. Krahn, A. Grenz, D. Kohler, M. Mittelbronn, C. Ledent, M.A. Jacobson, H. Osswald, L.F. Thompson, K. Unertl, H.K. Eltzschig, Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors, *Circulation*, 115 (2007) 1581-1590. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.669697
- [142] M. Idzko, D. Ferrari, H.K. Eltzschig, Nucleotide signalling during inflammation, *Nature*, 509 (2014) 310-317. doi: 10.1038/nature13085
- [143] H.K. Eltzschig, J.C. Ibla, G.T. Furuta, M.O. Leonard, K.A. Jacobson, K. Enjyoji, S.C. Robson, S.P. Colgan, Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors, *The Journal of experimental medicine*, 198 (2003) 783-796. doi: 10.1084/jem.20030891
- [144] F.S. Regateiro, D. Howie, K.F. Nolan, E.I. Agorogiannis, D.R. Greaves, S.P. Cobbold, H. Waldmann, Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF-beta, *European journal of immunology*, 41 (2011) 2955-2965. doi: 10.1002/eji.201141512
- [145] P.A. Beavis, J. Stagg, P.K. Darcy, M.J. Smyth, CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses, *Trends in immunology*, 33 (2012) 231-237. doi: 10.1016/j.it.2012.02.009
- [146] S.A. Levesque, F. Kukulski, K. Enjyoji, S.C. Robson, J. Sevigny, NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages, *European journal of immunology*, 40 (2010) 1473-1485. doi: 10.1002/eji.200939741
- [147] G. Hasko, P. Pacher, Regulation of macrophage function by adenosine, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32 (2012) 865-869. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.226852

- [148] F. Bonner, N. Borg, C. Jacoby, S. Temme, Z. Ding, U. Flogel, J. Schrader, Ecto-5'-nucleotidase on immune cells protects from adverse cardiac remodeling, *Circulation research*, 113 (2013) 301-312. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300180
- [149] G. Hasko, P. Pacher, E.A. Deitch, E.S. Vizi, Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors, *Pharmacology & therapeutics*, 113 (2007) 264-275. doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.08.003
- [150] B. Csoka, Z. Selmeczy, B. Koscsó, Z.H. Nemeth, P. Pacher, P.J. Murray, D. Kepka-Lenhart, S.M. Morris, Jr., W.C. Gause, S.J. Leibovich, G. Hasko, Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26 (2012) 376-386. doi: 10.1096/fj.11-190934
- [151] Z.H. Nemeth, C.S. Lutz, B. Csoka, E.A. Deitch, S.J. Leibovich, W.C. Gause, M. Tone, P. Pacher, E.S. Vizi, G. Hasko, Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism, *Journal of immunology*, 175 (2005) 8260-8270. doi: 10.4049/jimmunol.175.12.8260
- [152] B.S. Cain, D.R. Meldrum, C.A. Dinarello, X. Meng, A. Banerjee, A.H. Harken, Adenosine reduces cardiac TNF-alpha production and human myocardial injury following ischemia-reperfusion, *The Journal of surgical research*, 76 (1998) 117-123. doi: 10.1006/jsre.1998.5304
- [153] G. Hasko, C. Szabo, Z.H. Nemeth, V. Kvetan, S.M. Pastores, E.S. Vizi, Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice, *Journal of immunology*, 157 (1996) 4634-4640.
- [154] H.B. Cohen, K.T. Briggs, J.P. Marino, K. Ravid, S.C. Robson, D.M. Mosser, TLR stimulation initiates a CD39-based autoregulatory mechanism that limits macrophage inflammatory responses, *Blood*, 122 (2013) 1935-1945. doi: 10.1182/blood-2013-04-496216
- [155] P. Aoki Mdel, R.C. Cano, A.V. Pellegrini, T. Tanos, N.L. Guinazu, O.A. Coso, S. Gea, Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein, *Microbes and infection*, 8 (2006) 1723-1731. doi: 10.1016/j.micinf.2006.02.010
- [156] M.P. Aoki, E.A. Carrera-Silva, H. Cuervo, M. Fresno, N. Girones, S. Gea, Nonimmune Cells Contribute to Crosstalk between Immune Cells and Inflammatory Mediators in the Innate Response to *Trypanosoma cruzi* Infection, *Journal of parasitology research*, 2012 (2012) 737324. doi: 10.1155/2012/737324
- [157] M.P. Aoki, N.L. Guinazu, A.V. Pellegrini, T. Gotoh, D.T. Masih, S. Gea, Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes, *American journal of physiology. Cell physiology*, 286 (2004) C206-212. doi: 10.1152/ajpcell.00282.2003
- [158] N.E. Ponce, L.M. Sanmarco, N. Eberhardt, M.C. Garcia, H.W. Rivarola, R.C. Cano, M.P. Aoki, CD73 Inhibition Shifts Cardiac Macrophage Polarization toward a Microbicidal Phenotype and Ameliorates the Outcome of Experimental Chagas Cardiomyopathy, *Journal of immunology*, 197 (2016) 814-823. doi: 10.4049/jimmunol.1600371

- [159] L.M. Sanmarco, N.E. Ponce, L.M. Visconti, N. Eberhardt, M.G. Theumer, A.R. Minguez, M.P. Aoki, IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection, *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863 (2017) 857-869. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.01.006
- [160] L.M. Sanmarco, L.M. Visconti, N. Eberhardt, M.C. Ramello, N.E. Ponce, N.B. Spitale, M.L. Voza, G.A. Bernardi, S. Gea, A.R. Minguez, M.P. Aoki, IL-6 Improves the Nitric Oxide-Induced Cytotoxic CD8+ T Cell Dysfunction in Human Chagas Disease, *Frontiers in immunology*, 7 (2016) 626. doi: 10.3389/fimmu.2016.00626
- [161] L.M. Sanmarco, N. Eberhardt, G. Bergero, L.P. Quebrada Palacio, P.M. Adami, L.M. Visconti, A.R. Minguez, Y. Hernandez-Vasquez, E.A.C. Silva, L. Morelli, M. Postan, M.P. Aoki, Monocyte glycolysis determines CD8+ T cell functionality in human Chagas disease, *JCI insight*, 4 (2019). doi: 10.1172/jci.insight.123490
- [162] N. Guinazu, A. Pellegrini, L. Giordanengo, M.P. Aoki, H.W. Rivarola, R. Cano, M.M. Rodrigues, S. Gea, Immune response to a major *Trypanosoma cruzi* antigen, cruzipain, is differentially modulated in C57BL/6 and BALB/c mice, *Microbes and infection*, 6 (2004) 1250-1258. doi: 10.1016/j.micinf.2004.07.010
- [163] H. Cuervo, M.A. Pineda, M.P. Aoki, S. Gea, M. Fresno, N. Girones, Inducible nitric oxide synthase and arginase expression in heart tissue during acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice: arginase I is expressed in infiltrating CD68+ macrophages, *The Journal of infectious diseases*, 197 (2008) 1772-1782. doi: 10.1086/529527
- [164] N. Guinazu, A. Pellegrini, E.A. Carrera-Silva, M.P. Aoki, A.M. Cabanillas, N. Girones, M. Fresno, R. Cano, S. Gea, Immunisation with a major *Trypanosoma cruzi* antigen promotes pro-inflammatory cytokines, nitric oxide production and increases TLR2 expression, *International journal for parasitology*, 37 (2007) 1243-1254. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.03.010
- [165] A.F. Paroli, P.V. Gonzalez, C. Diaz-Lujan, L.I. Onofrio, A. Arocena, R.C. Cano, E.A. Carrera-Silva, S. Gea, NLRP3 Inflammasome and Caspase-1/11 Pathway Orchestrate Different Outcomes in the Host Protection Against *Trypanosoma cruzi* Acute Infection, *Frontiers in immunology*, 9 (2018) 913. doi: 10.3389/fimmu.2018.00913
- [166] S. Deaglio, K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.F. Chen, K. Enyoloji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, S.C. Robson, Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression, *The Journal of experimental medicine*, 204 (2007) 1257-1265. doi: 10.1084/jem.20062512
- [167] G. Hasko, B.N. Cronstein, Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity, *Trends in immunology*, 25 (2004) 33-39.
- [168] M. Sitkovsky, D. Lukashev, S. Deaglio, K. Dwyer, S.C. Robson, A. Ohta, Adenosine A2A receptor antagonists: blockade of adenosinergic effects and T regulatory cells, *British journal of pharmacology*, 153 Suppl 1 (2008) S457-464. doi: 10.1038/bjp.2008.23
- [169] F. Nagajyothi, F.S. Machado, B.A. Burleigh, L.A. Jelicks, P.E. Scherer, S. Mukherjee, M.P. Lisanti, L.M. Weiss, N.J. Garg, H.B. Tanowitz, Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence

- in Chagas disease, *Cellular microbiology*, 14 (2012) 634-643. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01764.x
- [170] E.A. Carrera-Silva, R.C. Cano, N. Guinazu, M.P. Aoki, A. Pellegrini, S. Gea, TLR2, TLR4 and TLR9 are differentially modulated in liver lethally injured from BALB/c and C57BL/6 mice during *Trypanosoma cruzi* acute infection, *Molecular immunology*, 45 (2008) 3580-3588. doi: 10.1016/j.molimm.2008.05.004
- [171] A.L. Caforio, S. Pankuweit, E. Arbustini, C. Basso, J. Gimeno-Blanes, S.B. Felix, M. Fu, T. Helio, S. Heymans, R. Jahns, K. Klingel, A. Linhart, B. Maisch, W. McKenna, J. Mogensen, Y.M. Pinto, A. Ristic, H.P. Schultheiss, H. Seggewiss, L. Tavazzi, G. Thiene, A. Yilmaz, P. Charron, P.M. Elliott, M. European Society of Cardiology Working Group on, D. Pericardial, Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases, *European heart journal*, 34 (2013) 2636-2648, 2648a-2648d. doi: 10.1093/eurheartj/eh210
- [172] G. Burnstock, J.M. Boeynaems, Purinergic signalling and immune cells, *Purinergic signalling*, 10 (2014) 529-564. doi: 10.1007/s11302-014-9427-2
- [173] F. Di Virgilio, J.M. Boeynaems, S.C. Robson, Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity, *Current opinion in pharmacology*, 9 (2009) 507-513. doi: 10.1016/j.coph.2009.06.021
- [174] M.S. Alam, M.G. Costales, C. Cavanaugh, K. Williams, Extracellular adenosine generation in the regulation of pro-inflammatory responses and pathogen colonization, *Biomolecules*, 5 (2015) 775-792. doi: 10.3390/biom5020775
- [175] C.B. Menezes, T. Tasca, Trichomoniasis immunity and the involvement of the purinergic signaling, *Biomedical journal*, 39 (2016) 234-243. doi: 10.1016/j.bj.2016.06.007
- [176] M.G. Costales, M.S. Alam, C. Cavanaugh, K.M. Williams, Extracellular adenosine produced by ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulates macrophage pro-inflammatory responses, nitric oxide production, and favors *Salmonella* persistence, *Nitric oxide : biology and chemistry*, 72 (2018) 7-15. doi: 10.1016/j.niox.2017.11.001
- [177] L. Petit-Jentreau, L. Tailleux, J.L. Coombes, Purinergic Signaling: A Common Path in the Macrophage Response against *Mycobacterium tuberculosis* and *Toxoplasma gondii*, *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7 (2017) 347. doi: 10.3389/fcimb.2017.00347
- [178] C.L.M. Silva, Purinergic signaling in schistosomal infection, *Biomedical journal*, 39 (2016) 316-325. doi: 10.1016/j.bj.2016.06.006
- [179] D.A. Mahamed, J.H. Mills, C.E. Egan, E.Y. Denkers, M.S. Bynoe, CD73-generated adenosine facilitates *Toxoplasma gondii* differentiation to long-lived tissue cysts in the central nervous system, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (2012) 16312-16317. doi: 10.1073/pnas.1205589109
- [180] M.S. Alam, J.L. Kuo, P.B. Ernst, V. Derr-Castillo, M. Pereira, D. Gaines, M. Costales, E. Bigley, K. Williams, Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulates host inflammatory responses and exacerbates murine salmonellosis, *Scientific reports*, 4 (2014) 4486. doi: 10.1038/srep04486

- [181] G. Burnstock, Purinergic Signaling in the Cardiovascular System, *Circulation research*, 120 (2017) 207-228. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309726
- [182] G. Burnstock, Purinergic Signalling: Therapeutic Developments, *Frontiers in pharmacology*, 8 (2017) 661. doi: 10.3389/fphar.2017.00661
- [183] C. Sorrentino, F. Hossain, P.C. Rodriguez, R.A. Sierra, A. Pannuti, B.A. Osborne, L.M. Minter, L. Miele, S. Morello, Adenosine A2A Receptor Stimulation Inhibits TCR-Induced Notch1 Activation in CD8+T-Cells, *Frontiers in immunology*, 10 (2019) 162. doi: 10.3389/fimmu.2019.00162
- [184] M. Koshiba, H. Kojima, S. Huang, S. Apasov, M.V. Sitkovsky, Memory of extracellular adenosine A2A purinergic receptor-mediated signaling in murine T cells, *The Journal of biological chemistry*, 272 (1997) 25881-25889. doi: 10.1074/jbc.272.41.25881
- [185] C. Linnemann, F.A. Schildberg, A. Schurich, L. Diehl, S.I. Hegenbarth, E. Endl, S. Lacher, C.E. Muller, J. Frey, L. Simeoni, B. Schraven, D. Stabenow, P.A. Knolle, Adenosine regulates CD8 T-cell priming by inhibition of membrane-proximal T-cell receptor signalling, *Immunology*, 128 (2009) e728-737. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03075.x
- [186] F. Nagajyothi, M.S. Desruisseaux, F.S. Machado, R. Upadhyaya, D. Zhao, G.J. Schwartz, M.M. Teixeira, C. Albanese, M.P. Lisanti, S.C. Chua, Jr., L.M. Weiss, P.E. Scherer, H.B. Tanowitz, Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain), *The Journal of infectious diseases*, 205 (2012) 830-840. doi: 10.1093/infdis/jir840
- [187] A.V. Ferreira, M. Segatto, Z. Menezes, A.M. Macedo, C. Gelape, L. de Oliveira Andrade, F. Nagajyothi, P.E. Scherer, M.M. Teixeira, H.B. Tanowitz, Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease, *Microbes and infection*, 13 (2011) 1002-1005. doi: 10.1016/j.micinf.2011.06.002
- [188] R. Faulhaber-Walter, W. Jou, D. Mizel, L. Li, J. Zhang, S.M. Kim, Y. Huang, M. Chen, J.P. Briggs, O. Gavrilova, J.B. Schnermann, Impaired glucose tolerance in the absence of adenosine A1 receptor signaling, *Diabetes*, 60 (2011) 2578-2587. doi: 10.2337/db11-0058
- [189] S.M. Johansson, E. Lindgren, J.N. Yang, A.W. Herling, B.B. Fredholm, Adenosine A1 receptors regulate lipolysis and lipogenesis in mouse adipose tissue-interactions with insulin, *European journal of pharmacology*, 597 (2008) 92-101. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.08.022
- [190] A. Buchheiser, A. Ebner, S. Burghoff, Z. Ding, M. Romio, C. Viethen, A. Lindecke, K. Kohrer, J.W. Fischer, J. Schrader, Inactivation of CD73 promotes atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice, *Cardiovascular research*, 92 (2011) 338-347. doi: 10.1093/cvr/cvr218
- [191] S. Burghoff, U. Flogel, S. Bongardt, V. Burkart, H. Sell, S. Tucci, K. Ikels, D. Eberhard, M. Kern, N. Kloting, J. Eckel, J. Schrader, Deletion of CD73 promotes dyslipidemia and intramyocellular lipid accumulation in muscle of mice, *Archives of physiology and biochemistry*, 119 (2013) 39-51. doi: 10.3109/13813455.2012.755547
- [192] W.P. Cawthorn, J.K. Sethi, TNF-alpha and adipocyte biology, *FEBS letters*, 582 (2008) 117-131. doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.051

- [193] M.J. Lee, S.K. Fried, Glucocorticoids antagonize tumor necrosis factor-alpha-stimulated lipolysis and resistance to the antilipolytic effect of insulin in human adipocytes, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 303 (2012) E1126-1133. doi: 10.1152/ajpendo.00228.2012
- [194] M. Ryden, A. Dicker, V. van Harmelen, H. Hauner, M. Brunnberg, L. Perbeck, F. Lonnqvist, P. Arner, Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha - mediated lipolysis in human fat cells, *The Journal of biological chemistry*, 277 (2002) 1085-1091. doi: 10.1074/jbc.M109498200
- [195] H.H. Zhang, M. Halbleib, F. Ahmad, V.C. Manganiello, A.S. Greenberg, Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP, *Diabetes*, 51 (2002) 2929-2935. doi: 10.2337/diabetes.51.10.2929
- [196] S.C. Souza, M.T. Yamamoto, M.D. Franciosa, P. Lien, A.S. Greenberg, BRL 49653 blocks the lipolytic actions of tumor necrosis factor-alpha: a potential new insulin-sensitizing mechanism for thiazolidinediones, *Diabetes*, 47 (1998) 691-695. doi: 10.2337/diabetes.47.4.691
- [197] M.E. Cabalen, M.F. Cabral, L.M. Sanmarco, M.C. Andrada, L.I. Onofrio, N.E. Ponce, M.P. Aoki, S. Gea, R.C. Cano, Chronic *Trypanosoma cruzi* infection potentiates adipose tissue macrophage polarization toward an anti-inflammatory M2 phenotype and contributes to diabetes progression in a diet-induced obesity model, *Oncotarget*, 7 (2016) 13400-13415. doi: 10.18632/oncotarget.7630
- [198] F. Nagajyothi, L.M. Weiss, D.L. Silver, M.S. Desruisseaux, P.E. Scherer, J. Herz, H.B. Tanowitz, *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion, *PLoS neglected tropical diseases*, 5 (2011) e953. doi: 10.1371/journal.pntd.0000953
- [199] C.C. Stempin, L.R. Dulgerian, V.V. Garrido, F.M. Cerban, Arginase in parasitic infections: macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals, *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010 (2010) 683485. doi: 10.1155/2010/683485
- [200] F.M. Sansom, S.C. Robson, E.L. Hartland, Possible effects of microbial ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases on host-pathogen interactions, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 72 (2008) 765-781, Table of Contents. doi: 10.1128/MMBR.00013-08
- [201] G. Burnstock, B. Vaughn, S.C. Robson, Purinergic signalling in the liver in health and disease, *Purinergic signalling*, 10 (2014) 51-70. doi: 10.1007/s11302-013-9398-8
- [202] A. Sciarra, I. Monteiro, C. Menetrier-Caux, C. Caux, B. Gilbert, N. Halkic, S. La Rosa, P. Romero, C. Sempoux, L. de Leval, CD73 expression in normal and pathological human hepatobiliopancreatic tissues, *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 68 (2019) 467-478. doi: 10.1007/s00262-018-2290-1
- [203] B.P. Vaughn, S.C. Robson, G. Burnstock, Pathological roles of purinergic signaling in the liver, *Journal of hepatology*, 57 (2012) 916-920. doi: 10.1016/j.jhep.2012.06.008

- [204] S. Shali, J. Yu, X. Zhang, X. Wang, Y. Jin, M. Su, X. Liao, J. Yu, X. Zhi, P. Zhou, Ecto-5'-nucleotidase (CD73) is a potential target of hepatocellular carcinoma, *Journal of cellular physiology*, 234 (2019) 10248-10259. doi: 10.1002/jcp.27694
- [205] P. de Andrade Mello, R. Coutinho-Silva, L.E.B. Savio, Multifaceted Effects of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in the Tumor-Host Interaction and Therapeutic Perspectives, *Frontiers in immunology*, 8 (2017) 1526. doi: 10.3389/fimmu.2017.01526
- [206] P. Wan, X. Liu, Y. Xiong, Y. Ren, J. Chen, N. Lu, Y. Guo, A. Bai, Extracellular ATP mediates inflammatory responses in colitis via P2 x 7 receptor signaling, *Scientific reports*, 6 (2016) 19108. doi: 10.1038/srep19108
- [207] N. Borg, C. Alter, N. Gorltdt, C. Jacoby, Z. Ding, B. Steckel, C. Quast, F. Bonner, D. Friebe, S. Temme, U. Flogel, J. Schrader, CD73 on T Cells Orchestrates Cardiac Wound Healing After Myocardial Infarction by Purinergic Metabolic Reprogramming, *Circulation*, 136 (2017) 297-313. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023365
- [208] G. Caputa, A. Castoldi, E.J. Pearce, Metabolic adaptations of tissue-resident immune cells, *Nature immunology*, 20 (2019) 793-801. doi: 10.1038/s41590-019-0407-0
- [209] X.T. Gan, S. Taniai, G. Zhao, C.X. Huang, T.J. Velenosi, J. Xue, B.L. Urquhart, M. Karmazyn, CD73-TNAP crosstalk regulates the hypertrophic response and cardiomyocyte calcification due to alpha1 adrenoceptor activation, *Molecular and cellular biochemistry*, 394 (2014) 237-246. doi: 10.1007/s11010-014-2100-9
- [210] P.J. Thul, L. Akesson, M. Wiking, D. Mahdessian, A. Geladaki, H. Ait Blal, T. Alm, A. Asplund, L. Bjork, L.M. Breckels, A. Backstrom, F. Danielsson, L. Fagerberg, J. Fall, L. Gatto, C. Gnann, S. Hober, M. Hjelmare, F. Johansson, S. Lee, C. Lindskog, J. Mulder, C.M. Mulvey, P. Nilsson, P. Oksvold, J. Rockberg, R. Schutten, J.M. Schwenk, A. Sivertsson, E. Sjostedt, M. Skogs, C. Stadler, D.P. Sullivan, H. Tegel, C. Winsnes, C. Zhang, M. Zwahlen, A. Mardinoglu, F. Ponten, K. von Feilitzen, K.S. Lilley, M. Uhlen, E. Lundberg, A subcellular map of the human proteome, *Science*, 356 (2017). doi: 10.1126/science.aal3321
- [211] A. Sato, K. Terata, H. Miura, K. Toyama, F.R. Loberiza, Jr., O.A. Hatoum, T. Saito, I. Sakuma, D.D. Gutterman, Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 288 (2005) H1633-1640. doi: 10.1152/ajpheart.00575.2004
- [212] X.Y. Cai, X.C. Ni, Y. Yi, H.W. He, J.X. Wang, Y.P. Fu, J. Sun, J. Zhou, Y.F. Cheng, J.J. Jin, J. Fan, S.J. Qiu, Overexpression of CD39 in hepatocellular carcinoma is an independent indicator of poor outcome after radical resection, *Medicine*, 95 (2016) e4989. doi: 10.1097/MD.0000000000004989
- [213] J. Pandolfi, A. Ferraro, M. Lerner, J.R. Serrano, A. Dueck, L. Fainboim, L. Arruvito, Purinergic signaling modulates human visceral adipose inflammatory responses: implications in metabolically unhealthy obesity, *Journal of leukocyte biology*, 97 (2015) 941-949. doi: 10.1189/jlb.3A1214-626R
- [214] Z.A. Andrade, Immunopathology of Chagas disease, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1 (1999) 71-80. doi: 10.1590/s0074-02761999000700007

- [215] L.C. Abel, L.V. Rizzo, B. Ianni, F. Albuquerque, F. Bacal, D. Carrara, E.A. Bocchi, H.C. Teixeira, C. Mady, J. Kalil, E. Cunha-Neto, Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection, *Journal of autoimmunity*, 17 (2001) 99-107. doi: 10.1006/jaut.2001.0523
- [216] H. Choudhry, A.L. Harris, *Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology*, *Cell metabolism*, 27 (2018) 281-298. doi: 10.1016/j.cmet.2017.10.005
- [217] F. Li, P. Sonveaux, Z.N. Rabbani, S. Liu, B. Yan, Q. Huang, Z. Vujaskovic, M.W. Dewhirst, C.Y. Li, Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation, *Molecular cell*, 26 (2007) 63-74. doi: 10.1016/j.molcel.2007.02.024
- [218] V. Schatz, Y. Strussmann, A. Mahnke, G. Schley, M. Waldner, U. Ritter, J. Wild, C. Willam, N. Dehne, B. Brune, J.M. McNiff, O.R. Colegio, C. Bogdan, J. Jantsch, Myeloid Cell-Derived HIF-1alpha Promotes Control of *Leishmania major*, *Journal of immunology*, 197 (2016) 4034-4041. doi: 10.4049/jimmunol.1601080
- [219] C. Souza Vdo, K.B. Schlemmer, C.B. Noal, J.A. Jaques, C.E. Zimmermann, C.A. Leal, J. Fleck, E.A. Casali, V.M. Morsch, M.R. Schetinger, D.B. Leal, E-NTPDase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease, *Parasitology international*, 61 (2012) 690-696. doi: 10.1016/j.parint.2012.07.008
- [220] R. Resta, L.F. Thompson, T cell signalling through CD73, *Cellular signalling*, 9 (1997) 131-139. doi: 10.1016/s0898-6568(96)00132-5
- [221] L. Airas, J. Hellman, M. Salmi, P. Bono, T. Puurunen, D.J. Smith, S. Jalkanen, CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73, *The Journal of experimental medicine*, 182 (1995) 1603-1608. doi: 10.1084/jem.182.5.1603
- [222] L. Airas, J. Niemela, S. Jalkanen, CD73 engagement promotes lymphocyte binding to endothelial cells via a lymphocyte function-associated antigen-1-dependent mechanism, *Journal of immunology*, 165 (2000) 5411-5417. doi: 10.4049/jimmunol.165.10.5411
- [223] A. Mikhailov, A. Sokolovskaya, G.G. Yegutkin, H. Amdahl, A. West, H. Yagita, R. Lahesmaa, L.F. Thompson, S. Jalkanen, D. Blokhin, J.E. Eriksson, CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis, *Journal of immunology*, 181 (2008) 464-475. doi: 10.4049/jimmunol.181.1.464
- [224] L. Airas, J. Niemela, M. Salmi, T. Puurunen, D.J. Smith, S. Jalkanen, Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells, *The Journal of cell biology*, 136 (1997) 421-431. doi: 10.1083/jcb.136.2.421
- [225] U. Dianzani, V. Redoglia, M. Bragardo, C. Attisano, A. Bianchi, D. Di Franco, U. Ramenghi, H. Wolff, L.F. Thompson, A. Pileri, et al., Co-stimulatory signal delivered by CD73 molecule to human CD45RAhiCD45ROlo (naive) CD8+ T lymphocytes, *Journal of immunology*, 151 (1993) 3961-3970.
- [226] M.G. Terp, K.A. Olesen, E.C. Arnspang, R.R. Lund, B.C. Lagerholm, H.J. Ditzel, R. Leth-Larsen, Anti-human CD73 monoclonal antibody inhibits metastasis formation in human

breast cancer by inducing clustering and internalization of CD73 expressed on the surface of cancer cells, *Journal of immunology*, 191 (2013) 4165-4173. doi: 10.4049/jimmunol.1301274

[227] S. Gessi, K. Varani, S. Merighi, E. Fogli, V. Sacchetto, A. Benini, E. Leung, S. Mac-Lennan, P.A. Borea, Adenosine and lymphocyte regulation, *Purinergic signalling*, 3 (2007) 109-116. doi: 10.1007/s11302-006-9042-y

[228] C. Quast, C. Alter, Z. Ding, N. Borg, J. Schrader, Adenosine Formed by CD73 on T Cells Inhibits Cardiac Inflammation and Fibrosis and Preserves Contractile Function in Transverse Aortic Constriction-Induced Heart Failure, *Circulation. Heart failure*, 10 (2017). doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003346

[229] F.F. Araujo, J.A. Gomes, M.O. Rocha, S. Williams-Blangero, V.M. Pinheiro, M.J. Morato, R. Correa-Oliveira, Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease, *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 12 (2007) 2797-2806. doi: 10.2741/2273

[230] J.A. Fiuza, R.T. Fujiwara, J.A. Gomes, M.O. Rocha, A.T. Chaves, F.F. de Araujo, R.C. Fares, A. Teixeira-Carvalho, O.A. Martins-Filho, G.G. Cancado, R. Correa-Oliveira, Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human chagas disease, *PLoS neglected tropical diseases*, 3 (2009) e512. doi: 10.1371/journal.pntd.0000512

[231] P.E. Souza, M.O. Rocha, E. Rocha-Vieira, C.A. Menezes, A.C. Chaves, K.J. Gollob, W.O. Dutra, Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity, *Infection and immunity*, 72 (2004) 5283-5291. doi: 10.1128/IAI.72.9.5283-5291.2004

[232] L.F. Thompson, H.K. Eltzschig, J.C. Ibla, C.J. Van De Wiele, R. Resta, J.C. Morote-Garcia, S.P. Colgan, Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia, *The Journal of experimental medicine*, 200 (2004) 1395-1405. doi: 10.1084/jem.20040915

[233] S.D. Parlee, S.I. Lentz, H. Mori, O.A. MacDougald, Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue, *Methods in enzymology*, 537 (2014) 93-122. doi: 10.1016/B978-0-12-411619-1.00006-9

[234] N. Eberhardt, L.M. Sanmarco, M.P. Aoki, Isolation and Phenotypic Characterization of Inflammatory Cells from Clinical Samples: Purification of Macrophages from Trypanosoma cruzi-Infected Hearts, *Methods in molecular biology*, 1955 (2019) 381-395. doi: 10.1007/978-1-4939-9148-8_28

[235] M. Piron, R. Fisa, N. Casamitjana, P. Lopez-Chejade, L. Puig, M. Verges, J. Gascon, J. Gomez i Prat, M. Portus, S. Sauleda, Development of a real-time PCR assay for Trypanosoma cruzi detection in blood samples, *Acta tropica*, 103 (2007) 195-200. doi: 10.1016/j.actatropica.2007.05.019

[236] A.-E.-. Ministerio de Salud- Guía para el equipo de salud: la atención al paciente infectado con Trypanosoma cruzi- Enfermedades Infecciosas- Ministerio de Salud y Desarrollo Social.

[237] J.C. Ramirez, C. Torres, M.L.A. Curto, A.G. Schijman, New insights into *Trypanosoma cruzi* evolution, genotyping and molecular diagnostics from satellite DNA sequence analysis, *PLoS neglected tropical diseases*, 11 (2017) e0006139. doi: 10.1371/journal.pntd.0006139

