

CIBICI - CONICET

Centro de Investigación en Bioquímica
Clínica e Inmunología

Inmunología

Depto. de Bioquímica Clínica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

TESIS DOCTORAL

Efecto de la infección con *Trypanosoma cruzi* en la evolución de enfermedades metabólicas inducidas por una dieta grasa: parámetros bioquímicos y respuesta inmune innata y adaptativa

Bioq. Luisina Inés Onofrio

lonofrio@fcq.unc.edu.ar

Director: Dra. Susana E. Gea

R-T

57429

0

13828

Aster

TESIS DOCTORAL

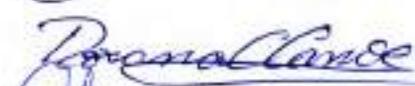
Efecto de la infección con *Trypanosoma cruzi* en la evolución de enfermedades metabólicas inducidas por una dieta grasa: parámetros bioquímicos y respuesta inmune innata y adaptativa

Comisión de tesis:

Dra. Claudia Bregonzio

Dra. Roxana Carolina Cano

Dr. Gustavo Nores



Evaluador externo: Dra. Gabriela Perdigón



A mis ojos de vida,

Rosay Luis

Qué lindo es llegar a esta etapa de la vida, luego de cinco años, y tener tanta gente a quien agradecer. Muchas veces sentí que recibía más de lo que yo podía dar... y no hablo sólo de **calidad científica**, sino de **calidez humana**, tan indispensable para mí al emprender cualquier desafío....

Quisiera agradecer en primer lugar a toda mi familia, por acompañarme en cada momento de la vida apoyando mis decisiones incondicionalmente, y aguantando mi locura en días previos de alguna rendida. A mis padres por ser ese ejemplo de lucha, voluntad, sacrificio y esfuerzo que te hace levantar una y otra vez después de una caída y ser ejemplo sobre todo de unión, **paciencia y tolerancia**.

Al amor de mi vida, hoy esposo y futuro padre de mis hijos, que nada de todo esto hubiera sido posible sin su apoyo, paciencia, diálogo y amor verdadero. El día a día nos unió...días de estudio, días de sorpresas, de trabajo, de risas, días de llanto (muchos) jaja y vos fuiste, sos y serás mi pilar y sostén en la vida. Soy muy feliz por esto. Eternamente gracias y gracias a Dios voy a tenerte todos los días de mi vida al lado caminando a la par....

A Susana por abrirme las puertas al grupo GEA allá en el año 2009 y confiar plenamente en mí. Por escucharme siempre, por su calidez y comprensión, por discutir, aconsejarme y salir adelante en las buenas y en las no tanto, siempre con palabras de aliento.

A mi querida Roxy que siempre estuvo ahí para auxiliarme en temas académicos y no académicos, con sus charlas y cariño. Gracias por hacerme sentir como una hija. Me diste alas para confiar y volar....

A Pilar por ayudarme cada vez que acudí en su auxilio y saberme entender...

A todo el Gea's team, así llamado por Andrea cuando entré en el laboratorio. Poco a poco los fui conociendo y hoy somos grandes amigos. Flaco, Antonio, Nico y mi pequeña Lili que día a día va creciendo a pasos agigantados y eso que es la secretaria oficial del consejero y todo!! jiji. Gracias a todos ustedes por soportarme!! y les agradezco enormemente todo lo compartido en estos años porque formaron a esta personita que hoy está culminando una etapa.

Al laboratorio 103: Adriana, Cristina, Caro M, Eva, Fabio, Horacio, Cinthi S., Lauri, Xime, Deivid, Cin, Fer S, Coty, Meli, Cris, Facu, Jime, Fer C., Ceci, a los que ya se han ido pero han sido importantes en mis primeros pasos: Dani B, Thami C, Carito A, Caro K, Lau D, Vani G....

Qué hermoso grupo humano de becarios que formamos, como los voy a extrañar..... Gracias a cada uno de ustedes y a los jefes también, por haberme enseñado mucho y compartir desde un mate hasta las cosas más íntimas, haciendo que cada día de trabajo, sobre todos aquellos en los que la ciencia no está de tu lado, tengan la razón más importante de ser vividos con alegría.

Jime T. por tu enorme empatía, por ponerte en el lugar del otro SIEMPRE y con tus palabras y gestos cotidianos ayudarme muchísimo!!! Gracias gracias y más gracias!! Me llevo una gran amiga.

La verdad que estos últimos años de mi vida fueron los mejores y estoy feliz de haberlos compartido de corazón con gente como ustedes. Cris que decirte a vos, dulce y sensible persona que más de una vez me levantó el ánimo con sus charlas y poesía. Te quieroo

A todo el 104, que mas bien formamos uno con el 103 el **103,5!!!** donde solo nos divide una "pared". Leo, compañero de tardes noches, porque en este último tiempo creo te moleste bastante jeje y Sole bueno mejor ni hablar jaja gracias por todo. Nati querida gracias por los buenos momentos que seguro seguirán!!! me prometiste cuidar a los mellis jejeje

A los del 108, 9, bromato por la ayuda brindada y en especial a Dani A. por tan lindas charlas entre almuerzos, pasillos y congresos.

No quiero dejar de agradecer a Pilar Crespo, Paula Abadi, Paula Icely a los Navarro, Diego y Elina por la paciencia ja y el tiempo dedicado. Y Pilar gracias por tus consejos "dobles" jeje.

Adri Berreta!!! Gracias por hacer tan simples las cosas, con tanta eficiencia y sobre todo con cordialidad. Ojalá todos tuvieran una secre como vos y te lleguen a conocer....gracias por las charlas y consejos compartidos.

Gracias a cada uno de ustedes y espero no olvidarme de nadie!!

Espero en alguna medida de mi corazón "pretencioso" haber dejado algo de mí en ustedes, haberlos ayudado, hecho reír.....porque si no siempre me sentiré en deuda!!!

"Mucho mejor atreverse a hacer cosas grandes, a obtener triunfos gloriosos, aun cuando matizados con fracasos, que formar en las filas de aquellos pobres de espíritu que ni gozan mucho ni sufren mucho porque viven en el crepúsculo gris que no conoce la victoria ni la derrota."

Theodore Roosevelt

ÍNDICE

Financiamiento	5
Resumen	6
Introducción general: <i>Trypanosoma cruzi</i> y alteraciones metabólicas	8
Hipótesis	20
Capítulo I: Efecto de la infección con <i>Trypanosoma cruzi</i> en fase crónica en un modelo experimental de esteatohepatitis no alcohólica	21
Introducción	22
Objetivos	34
Resultados	35
Conclusión	66
Discusión	67
Capítulo II: Efecto de la infección con <i>Trypanosoma cruzi</i> en fase crónica en un modelo experimental de alteraciones metabólicas con impacto en la aterogénesis	72
Introducción	73
Objetivos	76
Resultados	77
Conclusión	90
Discusión	91
Publicaciones	95
Materiales y Métodos	96
Abreviaturas y acrónimos	106
Bibliografía	108

FINANCIAMIENTO

Se agradece a las siguientes instituciones por el financiamiento otorgado, los cuales permitieron el desarrollo de la tesis:

- "Caracterización de los mecanismos de la respuesta inmune innata y adaptativa en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*: Participación de los receptores tipo Toll y mediadores inflamatorios". PIP 2010-2012 GI.
- "Inmunopatogenia de la enfermedad de Chagas: nuevas aproximaciones biotecnológicas". Programa de Cooperación Interuniversitaria e Investigación Científica entre España e Iberoamérica. Convocatoria 2009- A/025417/09.
- "Bases celulares y moleculares de la inflamación: la inmunidad innata y adquirida en la patogénesis de la infección experimental aguda con *Trypanosoma cruzi* y su efecto en la aterosclerosis". AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA Res N° 217/2006. ANPCyT-PICT 2010 N° PICT-2010-1696. 2011-2014. Resolución ANPCyT N° 98/11.
- "Modelo *in vitro* de aterosclerosis: Efecto de la infección con *Trypanosoma cruzi*, lipoproteínas de baja densidad y ácidos grasos sobre la expresión de receptores Toll like y scavengers en la formación de células espumosas en una línea celular de macrófagos". Subsidio otorgado por la Secretaría de Investigación y Post-Grado de la Universidad Católica de Córdoba. Años: 2009 – 2010. Resolución Rectoral N° 234.

Este estudio fue realizado enteramente en el CIBICI-CONICET, Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* es una de las causas principales de enfermedades cardíacas en las zonas endémicas de América Latina, pero en los últimos años las migraciones de personas han favorecido su difusión en los países no endémicos. La persistencia del parásito eventualmente resulta en graves complicaciones en los tejidos cardíaco y gastrointestinal, aunque este protozoo también infecta el hígado y el bazo. La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) constituye un problema de salud importante junto con el aumento de incidencia de la obesidad y la diabetes en el mundo y se caracteriza por la presencia de esteatosis, inflamación y lesión de los hepatocitos. Los receptores de la inmunidad innata tipo Toll (TLR) y las citoquinas juegan un papel crucial en el *clearance* de patógenos, así como en la aparición de la esteatohepatitis. Los mecanismos inmunológicos que subyacen al modelo de EHNA experimental y más interesante el efecto de *T. cruzi* en la patogénesis de este trastorno metabólico no han sido dilucidados.

En esta tesis evaluamos diferentes parámetros inmunológicos en ratones machos C57BL/6 de tipo salvaje (WT) y deficientes en el receptor tipo toll 4 (TLR4^{-/-}) alimentados con una dieta estándar baja en grasa, DC (3% de la grasa) como grupo control, o una dieta media en grasas (DG) que contiene 14% de grasa con el fin de inducir EHNA, o ratones infectados por vía intraperitoneal con 100 tripomastigotes de la cepa Tulahuen y alimentados a la vez con DC (I+DC) o DG (I+DG) por 24 semanas. Los experimentos demostraron que la DG indujo EHNA en ratones WT y la infección parasitaria generó marcados cambios metabólicos como la reducción del peso corporal y de la esteatosis forjada por la DG. A su vez, el *T. cruzi* en la fase crónica mejoró la resistencia a la insulina evaluada mediante el cálculo del índice del modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina (HOMA-IR), pero provocó un aumento de los triglicéridos en plasma y los niveles de colesterol. Macrófagos inflamatorios M1 y células T citotóxicas aisladas de leucocitos intra-hepáticos de animales DG y de grupos infectados mostraron una gran producción de citoquinas inflamatorias intracelulares, asociadas con altos niveles de citoquinas plasmáticas, tales como IL-6, IFN γ e IL17 y la quimiocina CCL2 en comparación con el grupo DC WT. El reclutamiento de linfocitos B, células NK y dendríticas en hígado fue incrementada por la DG y se intensificó por la infección

parasitaria. Estos resultados fueron dependientes de la señalización por TLR4. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y peroxinitritos producidos por leucocitos inflamatorios del hígado del grupo DG también se vieron exacerbadas por la infección parasitaria en nuestro modelo de EHNA.

En este escenario también se analizaron las modificaciones generadas en la arteria principal, la aorta. En nuestro modelo si bien no encontramos lesiones ateroscleróticas graves, se observaron alteraciones e inflamación en la adventicia en los grupos tratados vs. DC, los cuales podrían favorecer a la aparición de eventos tardíos relacionados a esta patología cardiovascular.

Los resultados obtenidos podrían ser extrapolados a la población humana, debido a que la infección en la fase crónica por *T. cruzi* presenta efectos sistémicos y locales de riesgo pro-aterogénico, lo que podría incidir en la morbilidad y mortalidad de personas con enfermedad de Chagas crónica. Estos hallazgos brindarían nueva información sobre el desarrollo de la aterosclerosis y de la EHNA en condiciones no forzadas, y su relación con la inflamación y la infección, además de tener consecuencias para la enfermedad de Chagas.

En este sentido, las elevadas parasitemias en la etapa aguda de la enfermedad, la mayor carga parasitaria en hígado y aorta en la fase crónica y la menor sobrevivencia en el grupo I+DG vs. I+DC, sostienen la hipótesis de que el exceso de calorías provenientes de grasas en la dieta, es un importante factor de riesgo para determinar la gravedad de la enfermedad parasitaria.

Nuestros resultados también sugieren un efecto sinérgico entre el daño asociado con patrones moleculares generados durante el proceso infeccioso y la esteatohepatitis, revelando una intensa comunicación entre los tejidos metabólicamente activos, tales como el hígado y el sistema inmune. Así, la infección por *T. cruzi* debe ser considerada como un factor de riesgo adicional, ya que exagera la inflamación y acelera el desarrollo de la lesión hepática y aórtica. Estos hallazgos pueden proporcionar una nueva visión para la esteatohepatitis asociada a la tripanosomiasis americana.

Introducción general

En los últimos años, diversas publicaciones muestran que enfermedades causadas por nematodos y protozoarios se asocian con deficiencias nutricionales, trastornos metabólicos y diabetes. En adición, se ha propuesto una asociación entre la infección con *T. cruzi*, la obesidad y la diabetes como un tópico de gran interés en el estudio de esta infección parasitaria.

Existe evidencia de las consecuencias metabólicas que produce la infección por *T. cruzi* en el hospedador, pero aún este sigue siendo un tema no totalmente dilucidado de gran importancia en la patogénesis de enfermedades metabólicas. Estudios previos demostraron que, ratones con diabetes inducida por químicos e infectados con *T. cruzi* tuvieron una mayor parasitemia y mortalidad que los controles. La misma observación tuvo lugar en ratones que fueron infectados y eran diabéticos genéticamente predispuestos (db/db), por tener una mutación en el gen del receptor de leptina [1]. También se ha reportado que la infección aguda de ratones CD1 con la cepa Brazil de *T. cruzi* se asocia generalmente a una hipoglucemia grave y, en general está correlacionado con la mortalidad [2]. Curiosamente, la respuesta metabólica a la sepsis bacteriana se asocia a menudo con la hiperglucemia, resistencia a la insulina y un profundo balance negativo de nitrógeno. Por lo tanto, la respuesta a esta infección parasitaria difiere de la observada en general en las sepsis bacterianas. Sería probable que la invasión del parásito en el hígado afecte el metabolismo de la glucosa y los lípidos.

Durante la infección aguda, los niveles basales de glucosa en ratones CD1 infectados con *T. cruzi* (cepa Brazil) se encontraron por debajo de los observados en los ratones control. En este contexto, el grupo de Tanowitz observó que a pesar de que los niveles de glucosa en ayunas de los animales infectados fueron menores, la prueba de tolerancia oral a la glucosa fue normal. Además, se encontraron incrementadas las citoquinas proinflamatorias TNF α , IL1 β , IFN γ y quimiocinas en el tejido adiposo de los ratones en la fase aguda de la infección [3]. Esta elevación a menudo persistió en la fase crónica.

Durante la etapa crónica de la infección, estudios de resonancia magnética, revelaron una disminución en el tejido adiposo abdominal. Los ratones que presentaron una marcada

dilatación del ventrículo derecho cardíaco tuvieron la mayor pérdida de depósitos de grasa [3].

Como es conocido, durante la infección aguda se produce un aumento de la parasitemia (número de parásitos en sangre) periférica. Durante la fase crónica los parásitos no son detectables en sangre periférica pero se ha demostrado la persistencia de parásitos en el tejido adiposo. Por lo tanto, este tejido es un sensor temprano y blanco de la infección por *T. cruzi* y a la vez un depósito durante la fase crónica, lo cual podría desencadenar la diseminación de la infección durante los períodos de inmunosupresión y/o estados lipoatróficos [4]. Recientemente, se ha demostrado que el aumento en ácidos grasos inducido por lipólisis local en el tejido adiposo llevan a un aumento del infiltrado de células inmunes, particularmente macrófagos [5].

Curiosamente, la infección por *T. cruzi* también lleva al aumento de la expresión de PI3 quinasa y la activación de AKT/ PKB, lo que sugiere que esta infección puede inducir componentes del receptor de cascada de señalización de la insulina/IGF-1. Esto sorprende, ya que la regulación positiva de las vías pro-inflamatorias se asocia generalmente con una regulación negativa de la vía de transducción de señal de insulina. No está establecida la causa responsable de este fenómeno. Es probable que el *T. cruzi* tenga un impacto en las vías de metabolismo de lípidos *in vivo*, sin embargo, estas cuestiones no han sido muy examinadas hasta la fecha. En este sentido existen algunos trabajos que sostienen que el *T. cruzi* se replica y persiste en los tejidos de hospedadores mamíferos con altas tasas de metabolismo de ácidos grasos (AG) [6], tales como músculo cardíaco, músculo liso y tejido adiposo [2, 7, 8]. La tasa de oxidación de AG en la mitocondria es controlado por el flujo de glucosa a través de la vía glucolítica y la tasa de conversión de piruvato a acetil CoA por la piruvato deshidrogenasa (PDH). La infección por *T. cruzi* desencadena en tejido cardíaco un incremento de la expresión temprana de genes de la β -oxidación de ácidos grasos del huésped seguido por una disminución del complejo PDH [9]. Como un regulador negativo de la PDH, la piruvato deshidrogenasa quinasa 4 (PDK4) funciona como el regulador principal del equilibrio entre la oxidación de ácidos grasos y de la glucosa [10]. El grupo de Caradonna en un trabajo reciente, sostiene que el crecimiento de *T. cruzi* está disminuido en células deficientes de PDK4 que muestran una mayor actividad PDH y una disminución de

la oxidación de ácidos grasos [11]. En los mamíferos, la β -oxidación se produce en los peroxisomas y las mitocondrias [12]. Los ácidos grasos de cadena muy larga ($\geq C22$) son transportados a los peroxisomas y se oxidan para producir ácidos grasos de cadena corta que son transportados a la mitocondria para su oxidación por un número de enzimas acil-CoA-deshidrogenasas (ACADs) y producir en última instancia, el acetil CoA [13]. En concordancia con la idea de que los amastigotes de *T. cruzi* prosperan en un ambiente que favorece la oxidación de ácidos grasos, proteínas peroxisomales implicadas en la activación/transporte de ácidos grasos de cadena muy larga y β -oxidación (ACAA1, IDH1) fueron identificadas en este escenario con una correlación positiva con el crecimiento intracelular de *T. cruzi*.

En resumen, el metabolismo de los lípidos y de la glucosa están interrelacionados y desregulados durante la infección por *T. cruzi*. El tejido adiposo es un depósito en el cual los parásitos pueden ser reactivados durante los periodos de inmunosupresión. Este proceso induce un fenotipo inflamatorio en dicho tejido que afecta una variedad de procesos metabólicos.

Infección con *Trypanosoma cruzi*

El parásito protozoario intracelular obligado *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, el cual se transmite al humano a través de insectos hematófagos, miembros de la subfamilia del insecto Triatominae. Esta infección se transmite también por otras vías: congénita, infección oral mediante comida contaminada, transfusiones de sangre, trasplante de órganos y por inoculación accidental en el laboratorio. En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud estima que aproximadamente 8 millones de personas están infectadas y 25 millones de personas en riesgo de infección [14]. Mientras la enfermedad de Chagas es endémica en América Central y del Sur, en los últimos años se han registrado personas infectadas en Estados Unidos, Europa y Japón [15, 16]. Por lo tanto, la globalización de la enfermedad de Chagas ha generado nuevos desafíos en la comprensión de los mecanismos patogénicos que subyacen en esta infección, el papel del sistema inmune y los enfoques terapéuticos a fin de minimizar o prevenir la enfermedad.

Clinicamente se pueden distinguir en la enfermedad de Chagas dos fases, aguda y crónica, (Fig.1) [17]. En la fase aguda, unos días después de la infección, aparecen lesiones inflamatorias tisulares donde los tripomastigotes metacíclicos infectan y comienzan con su ciclo de replicación. Dura alrededor de dos meses y es asintomática en la mayoría de los individuos infectados aunque algunos pacientes pueden presentar síntomas como fiebre prolongada, anorexia, náuseas, vómitos y diarrea. Esta fase se caracteriza por presentar elevada parasitemia, como así también niveles altos de citoquinas plasmáticas y una intensa activación de linfocitos T y B. También puede presentar linfadenopatía, hepato y esplenomegalia, y un gran proceso inflamatorio asociado a nidos de parásitos en los tejidos. Un pequeño grupo de personas infectadas, principalmente niños, (5-10%) pueden desarrollar una condición más severa presentando miocarditis o meningoencefalitis, las cuales son responsables de las muertes en estas fases. La mayoría de las personas infectadas permanecen asintomáticos (forma indeterminada), a menudo durante años o incluso décadas, pero alrededor del 30% de los pacientes desarrollan complicaciones cardíacas o gastrointestinales, características de la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Durante la fase crónica no es posible detectar parásitos en sangre y el corazón es el órgano más

severamente afectado originando cardiomiopatías que conducen a la falla cardíaca congestiva seguida de muerte. Las bases de la cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) ha sido tema de debate durante muchos años. La inmunopatología debido a la persistencia del parásito es considerada un elemento clave en el desarrollo de CCC aunque también hay numerosas evidencias de respuesta autoinmune [18-20].

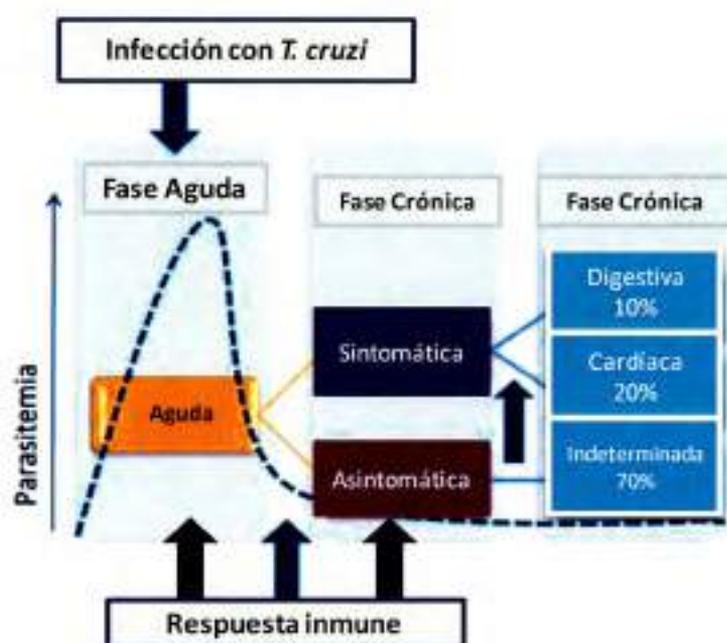


Figura 1. Progresión de la enfermedad de Chagas. Seguido a la infección con *T. cruzi* la mayoría de los individuos desarrollan parasitemias asociadas a una amplia respuesta inmune humoral y celular lo que involucra células de la respuesta inmune innata y adaptativa. Esta etapa se puede presentar con graves características clínicas que van desde fiebre alta a la arritmia y la muerte. Luego del control de la infección inicial por la respuesta inmune, la parasitemia disminuye y los síntomas desaparecen, ya que el individuo entra en la fase crónica de la enfermedad. Aquí la mayoría de los individuos entran en una forma clínica indeterminada, asociada con un balance inflamatorio y regulatorio de la respuesta inmune (índice inflamatorio bajo). Aproximadamente el 20 % de los individuos desarrollan cardiopatía de grado variable la cual se asocia con diferente grado de inflamación. Adaptado de Gollob, Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease, (2009).

Experimentalmente se utiliza preferentemente al ratón como modelo para la enfermedad de Chagas, debido a que estos animales son susceptibles a la infección con *T. cruzi* y desarrollan fases aguda y crónica similares a las descritas en seres humanos [21].

A pesar de la susceptibilidad y patogénesis de la enfermedad de Chagas en el modelo murino, el cual está determinado por numerosos factores entre ellos: la cepa del parásito y la base genética del ratón, el tamaño del inóculo y la vía de infección, los ratones evidencian claramente una fase aguda con parasitemia dentro de 7 a 30 días pos infección. Luego de ese período comienza la fase crónica que se caracteriza por la ausencia de parásitos en sangre y la presencia de cardiomiopatía caracterizada por infiltrado de células inflamatorias revelado mediante estudios histológicos y cuantificación de ADN parasitario [22, 23].

Respuesta inmune en la enfermedad de Chagas

El entendimiento de la interacción entre el huésped y el parásito y los mecanismos de la respuesta inmune involucrados en la protección y patogénesis de la enfermedad de Chagas es esencial para poder desarrollar nuevas terapias inmunomoduladoras y/o vacunas contra esta patología.

La infección con *T. cruzi* desencadena una respuesta inmune compleja debido a que es un patógeno intracelular e involucra una complicada comunicación e interacción de mecanismos celulares y humorales tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa del hospedador.

- **Inmunidad innata:** Las defensas innatas constituyen la primera línea de defensa contra los agentes infecciosos invasores. Comprenden células y mecanismos que defienden al huésped de la infección con otros organismos en una manera no específica, a través de los receptores de reconocimiento de patrones (sigla en inglés PRRs). Los PRRs son proteínas codificadas por línea germinal y altamente conservadas en la evolución, que pueden estar en diferentes tipos celulares y reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (sigla en inglés PAMPs) presentes en la superficie de microorganismos, como así también a patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) [24]. De esta manera, las células inmunes y parenquimales detectan cambios específicos en el ambiente extracelular

a través de sus PRRs e inician la defensa del hospedador. Así, frente a la presencia de una noxa, diferentes poblaciones de células inmunes innatas como los macrófagos, células dendríticas, *natural killer (NK)*, mastocitos, neutrófilos y eosinófilos, se activan y diferencian rápidamente a células efectoras cuya función principal es la de resolver la infección. La respuesta inmune innata paulatinamente recibe la cooperación de la inmunidad adaptativa. En forma conjunta, la defensa innata efectúa una valiosa función de retraso de la diseminación del patógeno mientras el sistema inmunitario adaptativo se prepara para actuar.

El parásito atraviesa la barrera de la piel y luego se disemina a la sangre y los tejidos "gatillando" la respuesta temprana de las proteínas del complemento y de fase aguda (principalmente proteína C reactiva, componente amiloide P sérico). Estas moléculas se unen al *T. cruzi* y median la endocitosis mediada por receptores. También macrófagos y células dendríticas expresan PRRs que se unen a PAMPs presentes en los microorganismos. Uno de los PRRs más estudiados son los *Toll-like receptors (TLRs)* (Fig. 2) [25, 26]. En la infección con *T. cruzi* se ha demostrado que TLR2 media la activación de una proteína de unión a un fosfonucleótido de guanina, Rab-5, la cual es necesaria para la internalización del parásito en macrófagos [27]. El grupo de Gazzinelli observó que la molécula del parásito glicosilfosfatidilinositol-mucina es un agonista de TLR2 y el compuesto conocido como glicoinositolfosfolípido conteniendo ceramida son reconocidos por TLR4. A su vez, los ligandos del parásito pueden generar la secreción de IL-12, ON y TNF α en macrófagos inflamatorios [28-30]. Entre las citoquinas, la IL-12 es un mediador importante para la producción de IFN γ a través de la inducción del desarrollo de células Th1 y la activación de células NK. En la muerte de este parásito intracelular, el IFN γ es una citoquina clave para la activación clásica del macrófago como célula parasiticida efectora. La muerte de los patógenos puede ser producida por el ON, el cual es citotóxico o citostático para microorganismos intracelulares [31] habiéndose demostrado que la deficiencia de IFN γ , IL12 u ON genera una elevada susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* [32-34].

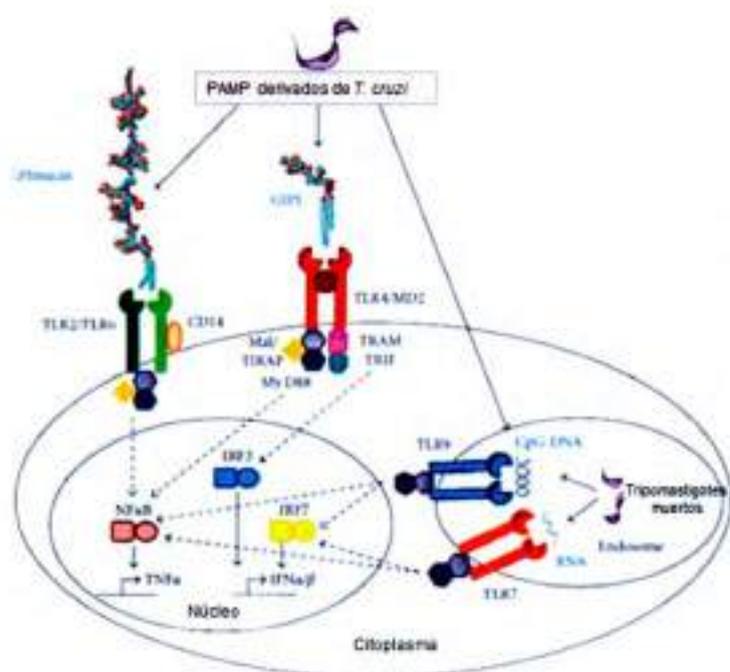


Figura 2. PAMPs derivados de *T. cruzi* son reconocidos por TLRs. El reconocimiento de diferentes moléculas de *T. cruzi*, como glicoconjugados de la superficie del parásito y ácidos nucleicos, ocurren a través de distintos receptores tipo Toll (TLR), los cuales se localizan en las membranas plasmáticas o endoplásmicas respectivamente, y se expresan diferencialmente por varias células de la inmunidad innata. Adaptado de Rodrigues MM. *Journal Parasitology Research*. 2012;507874.

En otro estudio empleando ratones deficientes en iNOS o NOS2 se demostró que el curso de la parasitemia, la carga parasitaria y la sobrevivencia en animales infectados con las cepas Brazil o Tulahuen eran similares a los ratones WT [35]. Resultados que sugieren que otras vías podrían estar controlando la infección. En este sentido, se demostró que la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) presente en macrófagos, es crítica para la resistencia del huésped contra la infección con este protozoario [36].

Por otro lado, se ha demostrado que el antígeno del *T. cruzi* llamado Tc52 interactúa con el TLR2 de células dendríticas estimulando su maduración y generando protección contra la infección [37, 38]. Recientemente en nuestro laboratorio se demostró que la cruzipaina purificada del *T. cruzi*, del mismo modo que la infección parasitaria, induce la expresión de TLR2 y produce la liberación de IL6 por cardiomiocitos lo cual favorece la sobrevivencia de estas células a través de la fosforilación de fosfoinositol 3 quinasa [39]. Además, el DNA del *T. cruzi* estimula la producción de citoquinas a través de la señalización de TLR9 en el interior de las células presentadoras profesionales [40].

Diversos estudios muestran la importancia de los TLRs al evidenciar que ratones deficientes en estos receptores presentaron mayores parasitemias y mortalidad asociado a

una alterada respuesta pro-inflamatoria [41, 42]. La deficiencia de TLR9 pero no de TLR2, llevaría a la susceptibilidad de la infección con *T. cruzi* [43].

En nuestro grupo, se observó recientemente una respuesta diferencial al comparar la inmunidad innata durante la infección aguda con *T. cruzi* en ratones BALB/c y C57/BL6. Se encontró que el exacerbado ambiente inflamatorio, con menores parasitemias asociado a un aumento de la expresión de TLR9 en ratones C57BL/6, podría ser el responsable de la elevada mortalidad y daño hepático fatal que presentaba esta cepa de ratón. Por otro lado, en la cepa BALB/c se observó una mayor expresión de TLR2 y TLR4 en comparación a C57BL/6 lo cual sería importante para mantener la homeostasis y la regulación de la inflamación. Un agonista de TLR2 (Pam3Cs) inyectado en la cepa C57BL/6 demostró ser una posible estrategia terapéutica para contrarrestar la inflamación exacerbada durante la infección aguda. [21, 44].

Por otro lado, también se ha informado el reconocimiento de *T. cruzi* por otros PRRs por ejemplo receptores tipo NLR (*Nod like receptor*) [45]. Se demostró que ratones deficientes para *Nod1* fueron muy susceptibles a la infección con *T. cruzi* presentando elevadas parasitemias y carga parasitaria en tejidos cardíacos y bazo además de incrementada mortalidad. Sin embargo, la ausencia de este receptor no modifica la producción de citoquinas como IL12, TNF α , IFN γ o IL10. Debido a que en ausencia de *Nod1* también se produce una respuesta de citoquinas se investigó la participación de otro NLR en la infección con *T. cruzi*, el NLRP3, el cual conjuntamente a ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*) forman el ensamblaje del inflamasoma activando caspasa-1 para la producción de IL1 β e IL18 activas. Este grupo también observó que al infectar ratones deficientes en ASC o caspasa-1 los ratones presentaron elevada mortalidad, mayor carga parasitaria e inflamación en tejido cardíaco, sugiriendo que el inflamosoma es crítico en la resistencia al huésped durante la infección con *T. cruzi* [46]. Otros autores reportaron además que ratones NLRP3 $^{-/-}$ y caspasa-1 $^{-/-}$ infectados con *T. cruzi* presentaron defectos severos en la producción de ON y alteraciones en la muerte parasitaria mediada por macrófagos, demostrando el rol importante de NLRP3 en controlar la infección [47].

-Conexión entre la inmunidad innata y adaptativa. Existe amplia evidencia que sostiene que la activación de células dendríticas u otras células de la inmunidad innata a través de los TLRs es fundamental en la modulación de la respuesta adquirida. Más allá de la relevancia de los TLRs en la inmunidad innata, el paradigma actual sostiene un papel crítico de estos receptores en la conformación de la respuesta inmune adaptativa [48]. Esto puede ser llevado a cabo principalmente por su acción sobre células presentadoras de antígeno (CPA), ya sea promoviendo la presentación cruzada para la activación de células T CD8, a través del incremento de moléculas co-estimuladoras e induciendo la secreción de citoquinas como IL12, IL6, IL1 β , IL18, and IL23 por parte de CPA y en consecuencia, promoviendo la diferenciación a Th1 y/o Th17. En este contexto, se ha reportado que ratones deficientes en MyD88 o en algunos TLRs e infectados con *T. cruzi* presentaron bajo número de linfocitos T CD4 (Th1) y niveles bajos de IL12 sérica con dificultades para inducir una respuesta óptima de células B o para la movilización de linfocitos T CD8 a los tejidos [49]. Sin embargo, en estos animales deficientes en MyD88 o en TLRs e infectados, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺IFN γ ⁺ y la actividad citotóxica *in vivo* de linfocitos CD8 se mantuvieron en niveles similares a los animales WT infectados [42, 50] sugiriendo que otras vías independientes de MyD88 estarían involucradas en los mecanismos de control de la infección.

-Inmunidad adaptativa. Durante la infección experimental aguda se desencadena la activación policlonal de linfocitos B lo que implica una intensa producción de inmunoglobulinas de diferentes especificidades. Esta respuesta es dependiente de células T CD4⁺ [51].

El *T. cruzi* es capaz de infectar casi todas las células en los tejidos del huésped [52], una vez internalizado puede escapar de las vacuolas parasitóforas en el citoplasma, sus antígenos parasitarios van a ser procesados y presentados en el contexto MHC clase I el cual va a ser reconocido por células T CD8⁺ [53, 54]. Las evidencias indican que las células citotóxicas tienen un rol protector en el control parasitario durante la infección, el mismo incluye la secreción de citoquinas que inducen la actividad microbicida en células del huésped (macrófagos, NK) y la muerte de células infectadas mediante perforinas/granzimas y/o apoptosis mediada por FAS [55-58]. Otros investigadores demostraron que células T

CD8 no pueden controlar completamente la infección debido a que se vuelven incapaces de responder [53].

Por otro lado, los antígenos parasitarios solubles, los parásitos muertos o los parásitos que no pudieron escapar de la vacuola parasitófora [59] serán presentados por CPA a través de MHC-II a los linfocitos T CD4, los cuales van a colaborar con las células B para inducir anticuerpos. Debido a que la infección con las formas amastigotes y tripomastigotes generan la síntesis de IL12 por células monocíticas/macrófagos e IFN γ por NK se sostiene fuertemente que los clones de células T específicas del parásito se diferencian a un fenotipo Th1. En concordancia con esto, se reportó durante la infección, que linfocitos T CD4, tanto en humanos como en ratones, producen elevados niveles de IFN γ [60, 61]. Además, se ha demostrado que los anticuerpos dominantes en la infección son los isotipos IgG2a en ratón e IgG1 en humano [62, 63] los cuales se conoce que son regulados por linfocitos Th1 e IFN γ . Es decir, los linfocitos T CD4 Th1 específicos contribuyen a través de la producción de IFN γ a la activación de macrófagos, a la diferenciación y activación de linfocitos T CD8 y a la síntesis de isotipos de Ig que favorecen la activación del sistema del complemento y a la opsonización o muerte celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Por otra parte, se ha documentado que pacientes con enfermedad de Chagas exhiben un perfil de citoquinas Th1 (IFN γ) con supresión del perfil Th2 (IL4, IL10) para controlar la infección. Además, experimentos de transferencia adoptiva de células T CD4 productoras de IL10 e IL4 incrementaron la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* en modelos experimentales. Por lo tanto, la polarización del perfil Th1/Th2 va a determinar la resistencia o la susceptibilidad de la infección con *T. cruzi* [25, 64, 65]

- **Regulación de la respuesta inmune.** Una vez desencadenada la respuesta inmune para eliminar al microorganismo patógeno es necesario que el organismo active mecanismos para controlar la respuesta inflamatoria y evitar el daño en los tejidos propios del huésped. En este sentido, las células T regulatorias han sido descritas como componentes importantes en la regulación inmune debido a que previenen la patología inducida por la infección y limitan la lesión tisular colateral causada por la exacerbada

respuesta anti-parasitaria [66]. También hay evidencia de la existencia de neutrófilos secretores de IL10 reclutados por IL17RA, los cuales estarían reduciendo la inflamación y la mortalidad durante la infección aguda con *T. cruzi* [67].

Por otro lado, estudios previos indican la existencia de células supresoras mieloides (CSMs) durante la infección aguda con *T. cruzi*, las cuales tendrían funciones supresoras mediante la producción de ON y la depleción de L-arginina por arginasa-1. Se demostró que esta población celular se acumula en el corazón y el bazo para llevar a cabo su función supresora durante la infección con este parásito [68, 69]. Recientemente, nuestro grupo demostró que las CSMs juegan un rol central en la resolución de la inflamación durante la infección aguda con *T. cruzi* cepa Tulahuen [70].

HIPÓTESIS

En base a los antecedentes descriptos, especulamos que el *T. cruzi*, podría comportarse como un factor agravante de la EHNA y ser un factor pro-aterogénico potencial, ya que en su estructura posee componentes capaces de interactuar con receptores tipo *Toll*, principalmente TLR2 y 4, participantes de la respuesta inmune innata. Esta interacción induce una cascada de señalización intracelular que se traduciría en la síntesis de citoquinas inflamatorias y quimiocinas, moléculas de adhesión celular, migración de células al órgano *target* de lesión y otros eventos bioquímicos y celulares, que actuando en conjunto podrían acelerar el curso de tales patologías, como consecuencia de la infección parasitaria-respuesta inflamatoria.

Además, ligandos endógenos como LDLox y ácidos grasos producidos por la dieta media en grasas podrían contribuir a la hiperactivación sostenida de estos receptores, transformando la respuesta inicialmente homeostática en patogénica. Asimismo, se podría hipotetizar que la infección con este protozoario y la combinación con una dieta rica en lípidos, debido a un aumento del peso corporal y otras consecuencias metabólicas (endotoxemia) potenciarían en forma sinérgica la inflamación y el estrés oxidativo provocados por la infección parasitaria. Sin embargo, otra hipótesis que no deberíamos descartar es que la respuesta inflamatoria pueda ser modulada en la etapa crónica en las condiciones experimentales propuestas.

Asimismo, es posible sugerir que la alimentación media en grasas podría favorecer la tasa de proliferación de este protozoo en tejidos metabólicamente activos con una elevada actividad de la vía β -oxidación de ácidos grasos.

Por otra parte, pensamos que diferentes estímulos como la infección *in vitro* con *T. cruzi* y lipoproteínas, específicamente las LDL pueden activar a los receptores tipo *Toll* y *scavenger-CD36*. Consecuentemente, se producirían citoquinas inflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión intercelular y procoagulantes. El perfil de moléculas inflamatorias y el depósito de esteres de colesterol en macrófagos, vía CD36, que no permitiría regular la homeostasis del colesterol intracelular, favorecerían la formación de células espumosas, los cuáles son eventos bioquímicos y celulares claves para el inicio de la aterogénesis.

Capítulo I

CAPÍTULO I

Efecto de la infección con *Trypanosoma cruzi* en la fase crónica en un modelo experimental de esteatohepatitis no alcohólica

INTRODUCCIÓN CAPÍTULO I

➤ Esteatohepatitis no alcohólica

La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) es una enfermedad crónica inflamatoria del hígado que ocurre en pacientes que no consumen o que tienen una ingesta mínima de alcohol (20-40g/día), en ausencia de otras causas secundarias de acumulación grasa a nivel hepático. Esta patología se caracteriza por la presencia de esteatosis e infiltrado inflamatorio mixto en el hígado. En 1980, Ludwig y col la describieron por primera vez como "Esteatohepatitis no alcohólica" [71] y en la actualidad es además considerada como la manifestación hepática del síndrome metabólico (SM) [72]. Esta enfermedad está influenciada por factores de riesgo del SM [73] y por la insulino resistencia (IR) asociada con esteatosis, sobrepeso, dislipemia, hiperinsulinemia e hipertensión arterial [72].

La sociedad ha experimentado un cambio a nivel mundial en el estilo de vida hacia un mayor consumo de comida rápida (comida chatarra con alto contenido en lípidos), estrés crónico y menos actividad física [74]. Las enfermedades de hígado graso no alcohólico (HGNA) están constituyendo la principal causa de enfermedades hepáticas que pueden progresar a EHNA, la cual constituye una gran preocupación en el ámbito de la salud humana.

Se estima que la EHNA afecta al menos al 10-20% de la población general [75-78] y actualmente, no existen estudios de prevalencia con un buen diseño en Argentina. Estudios realizados en La Fundación Favalaro en Buenos Aires indican que de 1000 pacientes que se realizan el control anual, un 25% presenta EHNA, datos coincidentes con los números de otros países de Europa y USA.

La causa de la acumulación de grasa en el hígado no se conoce con exactitud, pero existen mecanismos muy importantes en el desarrollo de esta enfermedad tales como la IR, el estrés oxidativo y la liberación de citoquinas, entre otros.

➤ Posibles mecanismos patogénicos de EHNA

Se han utilizado varios modelos animales que desarrollan signos similares, a fin de establecer los mecanismos patogénicos de las enfermedades de HGNA y su progresión a la EHNA. Entre ellos, los más frecuentemente utilizados son los modelos genéticos de obesidad (ob/ob, con una mutación del gen de leptina y db/db, deficientes en el receptor de leptina) y otros modelos inducidos por ciertas dietas (*high fat diet: HFD*, alta en contenido graso, o rica en fructosa, deficiente en colina-metionina, etc) [79]. Los mecanismos patogénicos involucrados en la EHNA primaria no han sido totalmente explorados y parecen ser multifactoriales, complejos e implican la interconexión entre diferentes tejidos metabólicamente activos. Day y James en 1998 [80] propusieron considerar la secuencia de "dos eventos", en primer lugar aquellos mecanismos que promueven el desarrollo de la esteatosis hepática y posteriormente los factores que determinan la inflamación, característica de la EHNA. La hipótesis inicial de "dos eventos" describe la IR como el "primer evento" que lleva a la esteatosis hepática, seguido por un "segundo evento" el cual es desencadenado por el estrés oxidativo, que a su vez conduce al desarrollo de la esteatohepatitis. Esta hipótesis ha sido ampliada a "múltiples eventos" en la que diferentes procesos puede contribuir a la inflamación tisular. Indudablemente, los mediadores inflamatorios producidos en el hígado, el tejido adiposo y el intestino, jugarían un papel clave en los procesos de inflamación, fibrosis y, finalmente, la tumorigénesis hepática.

✓ *Primer evento*

Además de la propia lipogénesis hepática, los ácidos grasos libres (AGL) provenientes de la absorción intestinal o de la lipólisis del tejido adiposo (TA) se transportan al hígado. Dentro del hepatocito los AGL son esterificados a triglicéridos, uniéndose al glicerol, parte de los cuales son exportados de la célula hepática como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) mediante exocitosis o sufren la oxidación en las mitocondrias, peroxisomas o microsomas [81]. El incrementado nivel de lípidos en los hepatocitos, mayormente como TG en pacientes con EHNA, resulta de un desbalance entre sistemas enzimáticos que promueven la incorporación y síntesis de AG y los que estimulan su oxidación y salida. El incremento en la captación de AGL por parte del hígado excede su capacidad para metabolizarlos mediante la β -oxidación mitocondrial y removerlos por liberación a la

sangre bajo la forma de VLDL debido a un descenso en la producción hepática de apolipoproteína B-100 [82, 83], así como a un aumento en su degradación [84]. De este modo se desarrolla la esteatosis hepática.

✓ *Segundo evento*

A la esteatosis se suma la inflamación a través del reclutamiento y activación de células inflamatorias en el hígado, lo cual promueve a la esteatohepatitis [85]. El aumento de los AGL dentro de los hepatocitos lleva a una sobrecarga de la beta oxidación mitocondrial. Los AGL son sustratos e inductores del citocromo P450 2E1 (CP450 2E1). El nivel de CP450 2E1 se incrementa en el hígado de pacientes con EHNA y puede resultar en una producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) capaces de producir la lipoperoxidación de las membranas del hepatocito llevando a su apoptosis [86].

La extensiva peroxidación de lípidos también se produce en ratones transgénicos en los cuales el gen del CP450 2E1 se ha eliminado, sugiriendo que otras enzimas del CP450 podrían tener un rol en este proceso. Se ha identificado la enzima 4A como iniciadora alternativa de estrés oxidativo en el hígado [87]. La acumulación excesiva de AGL induce estrés oxidativo en los hepatocitos no sólo en las mitocondrias, sino también en los peroxisomas o microsomas.

Las ERO mitocondriales promueven la progresión desde la esteatosis a las EHNA y fibrosis por tres mecanismos principales: peroxidación lipídica, inducción de citoquinas e inflamación [88]. Las ERO gatillan la peroxidación lipídica que causan la muerte celular a través del aumento de expresión en la molécula apoptótica FAS. Existe además, una quimiotaxis de neutrófilos, y monocitos que promueven la inflamación tisular. Las ERO también inducen la translocación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) que induce la síntesis de TNF α y varias citoquinas pro-inflamatorias tales como IL6 o IL8 [89].

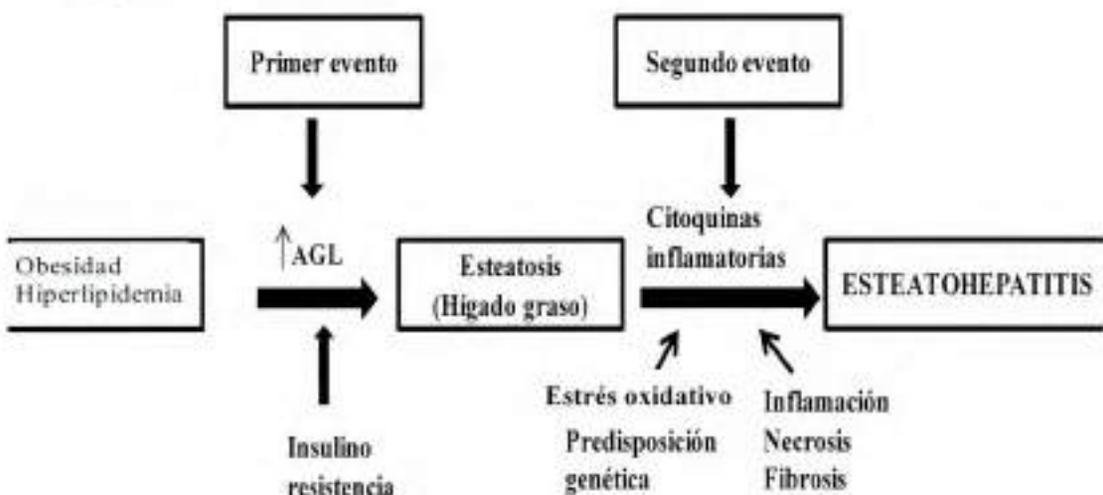
En este contexto, el estrés del retículo endoplásmico, citoquinas y adipoquinas, así como la inmunidad están surgiendo como los conductores claves de las características de la EHNA (Fig. 3) [90, 91].

Además, el propio hígado muestra propiedades inmunológicas y puede ser visto como un "órgano inmunológico" [91], es un órgano clave que controla la homeostasis metabólica

de lípidos, carbohidratos y proteínas. Numerosos reportes demuestran que el hígado tiene propiedades inmunológicas específicas y contiene una gran cantidad de células residentes y no residentes que participan en la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias [92, 93] y la desregulación de las funciones hepáticas puede llevar a desórdenes metabólicos.

Se han realizado muchos esfuerzos para entender el papel del sistema inmune en la patogénesis de EHNA en vistas también de su relevancia como potencial terapéutico.

Figura 3.



➤ Mecanismos inmunológicos involucrados en la fisiopatología de la EHNA

Inmunidad Innata

Frente a la presencia de una noxa, diferentes poblaciones de células inmunes innatas como los macrófagos, células dendríticas, mastocitos, neutrófilos y eosinófilos, se activan y diferencian rápidamente a células efectoras cuya función principal es la de resolver la injuria provocada por EHNA.

• Macrófagos/células de Kupffer

Las células de Kupffer (CK) constituyen la mayor población de macrófagos residentes del tejido hepático. Estas células se originan en la médula ósea con la generación de promonocitos y monoblastos en monocitos; estos en la sangre periférica completan su diferenciación y se localizan en el hígado, donde tienen su residencia en el espacio

sinusoidal circulante, especialmente en el área periportal. Bajo condiciones basales, CK pueden inhibir la activación de células T específicas de antígeno inducidas por células dendríticas (CDs) y pueden promover la actividad supresora de las células T reguladoras (T regs) [94]. Después de la activación por antígenos bacterianos, tales como lipopolisacárido bacteriano (LPS), o moléculas endógenas, las CK modulan la diferenciación y activación de diversas células inmunes, incluyendo CDs, linfocitos T y neutrófilos. Estos macrófagos hepáticos también pueden interactuar directamente con los hepatocitos [91]. Además, CK pueden contribuir a la lesión hepática a través de la producción de citoquinas pro-inflamatorias, de ERO y mediante la activación del complemento. Los macrófagos son las primeras células de la inmunidad innata en responder a una injuria hepática, llevando a la producción de TNF α , inducción de quimiocinas y reclutamiento de monocitos. La depleción de macrófagos en modelos murinos de EHNA reduce la incidencia de injuria hepática, esteatosis e inflamación [95]. Estas células están implicadas en el inicio del EHNA mediante la señalización de TLRs. En hígado se reportó que la activación del receptor TLR4 por sus ligandos, tales como LPS o ácidos grasos[96]s, es muy importante en el desarrollo de esteatosis, en la injuria hepática, la inflamación y fibrosis en EHNA inducido por una dieta especial [97-100]. Por otra parte, la activación de TLR9 estimula la producción de IL1 β por parte de las CK, la cual estaría involucrada en la acumulación hepática de lípidos, en la muerte celular y en la fibrogénesis [101, 102]. Por el contrario, TLR2 parecería tener un papel protector de la injuria tisular [103]. Finalmente en el tejido adiposo de los ratones alimentados con HFD, la activación de macrófagos puede ser inducida a través del reconocimiento de AGL por TLR4 y TLR2 [104], destacando el papel de la señalización TLR también en este nivel.

Entre otros PRRs, es importante destacar la presencia de receptores "*scavenger*" (RS) en la superficie de macrófagos, tales como: CD36 y RS de macrófagos 1 (MSR1). CD36 se une a lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox), y está implicado en la activación de JNK inducida por LDLox [105]. En base a sus diferentes funciones en la transducción de señales inflamatorias, se ha propuesto que CD36 y MSR1 contribuyen de forma independiente a la aparición de la inflamación hepática modificando la distribución del colesterol en el interior CKs [106]. Se ha demostrado que la supresión hematopoyética de

los RS CD36 y MSR1 en ratones deficientes en el receptor de LDL (*Ldlr*^{-/-}) atenúa la inflamación hepática [107].

Es bien conocido que el comportamiento de los macrófagos es heterogéneo y su perfil de activación se extiende entre dos estados polarizados "activado clásicamente" o pro-inflamatorio denominado M1 y el "activado alternativamente" o anti-inflamatorio llamado M2 [108]. En EHNA, las CK están expuestas a una variedad de señales que llevan a un cambio en su fenotipo hacia un perfil M1 [109].

Macrófagos M1 son inducidos por mediadores pro-inflamatorios, tales como LPS o IFN γ , y, a su vez, conducen a la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF α , IL6, IL12, y a la activación de la enzima iNOS. Las citoquinas liberadas por M1 también pueden promover la síntesis de triglicéridos e inhibir la oxidación de AG [110]. Estas células a menudo se ubican alrededor de los adipocitos necróticos y forman una estructura con forma característica de "corona" [111].

Por otra parte, los macrófagos polarizados hacia un perfil M2 pueden ser inducidos por diversos estímulos entre otros, IL4 y IL13 [108]. Se caracterizan por producir citoquinas anti-inflamatorias como IL10, y su activación favorece el incremento de la actividad de la arginasa, capaz de competir por el mismo sustrato (L-arginina) con la enzima iNOS [112]. Esta población de células está presente en el tejido adiposo de ratones delgados, lo que sugiere una función benéfica de estas células. Además macrófagos M2 (F4/80⁺CD11c⁻CD206⁺) se encuentran disminuidos en la obesidad. Estos resultados están en concordancia con el papel protector de la IL-10 en la IR, contrarrestando el efecto de las citoquinas pro-inflamatorias como el TNF α [113]. Se ha demostrado que macrófagos F4/80⁺CD11b⁺CD11c⁺ [114] así como F4/80⁺CD11c⁻CD206⁻ [115] asociados a un perfil M1, se acumulan en el tejido adiposo y sobre-expresan genes inflamatorios en ratones alimentados con HFD. De manera sorprendente la IL10 también se sobre-expresa después de HFD, probablemente en relación con el reclutamiento de macrófagos M2 en el tejido adiposo en respuesta a ese tipo de dieta [115]. En modelos murinos de obesidad inducida por HFD también se observó al igual que en EHNA, un cambio del fenotipo de macrófagos hacia un perfil M1 [108, 115]. Este fenómeno parece estar relacionado al receptor de la quimiocina 2 (CCR2) del cual depende el reclutamiento de monocitos. De manera

interesante, la inhibición de la quimiocina MCP1/CCL2 induce una mejora en la esteatohepatitis y el SM [116].

Durante el desarrollo de las EHNA, la quimiocina CCL2 y su receptor se incrementan en el hígado promoviendo la acumulación de macrófagos, la inflamación, esteatosis y fibrosis, como así también, su acumulo en tejido adiposo. Por lo tanto, la señalización dada por CCL2, vincula la inflamación hepática y sistémica relacionada con trastornos metabólicos y la IR [117]. En animales deficientes de CCL2 o CCR2, el número de macrófagos se redujo en un 80% en el hígado y alrededor del 40% en tejido adiposo. En concordancia con estos resultados, CCL2 también ha sido detectada en el suero y el hígado de pacientes con EHNA [118]. Evidencia similar, aunque no tan consistente como para CCL2, describe el papel del receptor CCR5. Quimiocinas como CXCL12 y CXCL13 parecen estar involucradas en modelos experimentales de obesidad [119].

- Neutrófilos, eosinófilos y Mastocitos

Se ha descrito que los neutrófilos están implicados en la fase temprana de la inflamación del tejido adiposo, ya que pueden infiltrarse transitoriamente en dicho tejido de los ratones alimentados con HFD [120, 121]. Además, la mieloperoxidasa (MPO), una enzima oxidante de neutrófilos, se sugirió que participa en la peroxidación de lípidos en la esteatosis. Adicionalmente se observó que los neutrófilos y los productos de oxidación mediados por MPO se incrementaron en biopsias hepáticas de pacientes con EHNA en comparación con una simple estosis [122].

Los eosinófilos constituyen las principales células productoras de IL4 en el tejido adiposo murino. La disminución de eosinófilos favorece el desarrollo del deterioro de la tolerancia a la glucosa y la IR inducida por HFD, mientras que la eosinofilia inducida por el tejido adiposo por helmintos es capaz de mejorar el metabolismo de la glucosa [123].

Se han encontrado también un número aumentado de mastocitos en el tejido adiposo blanco de los humanos y ratones obesos [124]. Además experimentos de transferencia adoptiva de células cebadas deficientes en citoquinas mostraron un papel clave de las

citoquinas pro-inflamatorias IL6 e INF γ producidas por los mastocitos en el desarrollo de la obesidad inducida por la dieta y la intolerancia a la glucosa [124].

Células Dendríticas

Las CD son células presentadoras de antígenos profesionales que se pueden encontrar en los tejidos extra-linfoide, incluyendo el hígado, donde residen alrededor de las venas centrales y espacios porta. Después de su activación pueden migrar a través del espacio de Disse a los conductos linfáticos y tractos portales para llegar a los ganglios linfáticos extrahepáticos. Las CD están implicadas en la inducción de tolerancia inmunológica central y periférico, en la regulación de la respuesta inmune de células T y son las células que actúan como centinela de la inmunidad innata en el reconocimiento de patógenos microbianos. La función específica de CD es dependiente de la heterogeneidad de los subconjuntos de CD y su plasticidad funcional [91].

La eliminación de CD en EHNA exacerbó la inflamación fibro-intrahepática [125, 126]. En ratones las CD inducen también la diferenciación a Th17; en los seres humanos el aumento de las CD derivadas de TA subcutáneo se correlacionaron con un aumento del Índice de Masa Corporal (IMC) y de las células Th17.

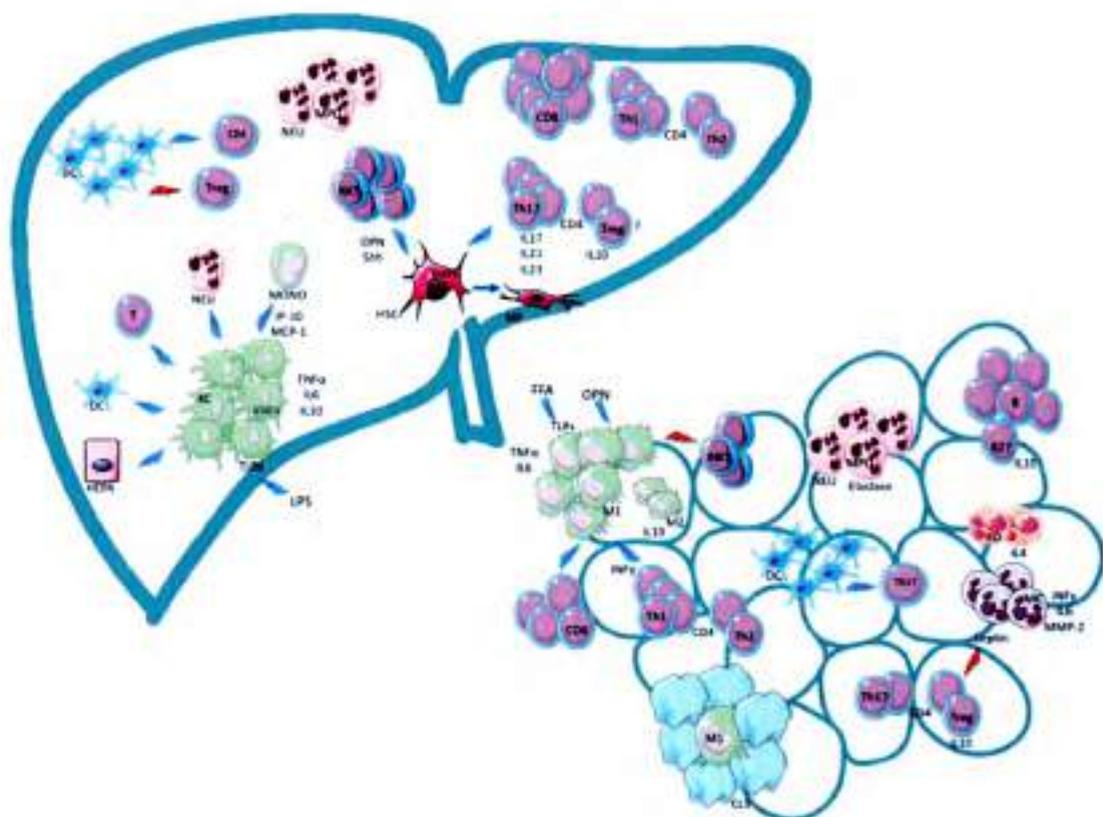


Figura 4. Descripción general de las vías inmunes implicadas en la patogénesis de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). DC: células dendríticas; Treg: célula T reguladora; NKT: las células T asesinas naturales; NEU: neutrófilos; MONO: monocitos; HEPA: hepatocitos; HSC: células estrelladas hepáticas; MF: miofibroblasto; KC: las células de Kupffer; EO: eosinófilos; T: Linfocitos T; B: linfocitos B; M: macrófagos; CLS: estructura like corona; OPN: osteopontina; LPS: lipopolisacárido; FFA: ácidos grasos libres; IP-10: proteína-10 inducida por interferón γ ; MCP-1: proteína de monocitos-1 quimiotáctica; MMP-2: metaloproteínasa-2; MPO: mieloperoxidasa; TLR: receptor Toll-like; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; IL: interleuquina. Rayos azules indican estimulación y rayos rojos indican inhibición. (Luisa Vonghia, "Immunological Mechanisms in the Pathophysiology of Non-Alcoholic Steatohepatitis" *Int. J. Mol. Sci.* **2013**).

Inmunidad Adaptativa

La inmunidad adaptativa se caracteriza por la especificidad antigénica, la diversidad, la memoria inmunológica, y el reconocimiento entre lo propio y no propio. Esta respuesta inmune está mediada por linfocitos T y B y una variedad de moléculas que orquestan las interacciones celulares [127].

- Linfocitos T CD4 y CD8

En modelos experimentales de EHNA se ha observado un incremento de la relación $CD8^+/CD4^+$ en el hígado [125]. A nivel del TA visceral, se ha demostrado un aumento de las células $CD3^+$ en seres humanos y en ratones [128]. Dependiendo del entorno de citoquinas, las células Thelper pueden asumir un fenotipo pro-inflamatorio (Th1), que se caracteriza por la liberación de $INF\gamma$ y $TGF\beta$ o un fenotipo anti-inflamatorio (Th2), que se caracteriza por la liberación de IL4, IL5, IL13 e IL10. La transferencia de células T $CD4^+$ Th2 puede regular negativamente el aumento de peso, la masa de tejido adiposo visceral, hiperglucemia y aumento de citoquinas ($TNF\alpha$ e IL6) inducida por HFD [129]. El equilibrio entre Th1 y Th2 es importante en la conducción de la respuesta inmune. Un desequilibrio entre un exceso relativo de citoquinas pro-inflamatorias y una deficiencia relativa de citoquinas anti-inflamatorias se ha encontrado en el contexto de la EHNA tanto en el hígado [130] como en el tejido adiposo visceral [129].

El aumento en el perfil Th1 puede inducir, a través de $INF\gamma$, la infiltración de macrófagos M1 polarizados en el tejido adiposo de ratones obesos, acompañado por aumento de la expresión de $TNF\alpha$ y CCL2 [131]. Las células T citotóxicas $CD8^+$ aumentan rápidamente en la almohadilla plantar durante la dieta alta en grasas [132]. La depleción inmunológica o genética de las células $CD8^+$ reduce la infiltración de macrófagos, la liberación de mediadores pro-inflamatorios (IL1, IL6 y CCL2) en el TA, y la IR [133]. Estos resultados destacan el papel de las células $CD8^+$ en la iniciación y propagación de la inflamación del TA. Otras poblaciones de linfocitos T $CD4^+$ son las Treg y las células Th17 secretoras de IL17. El equilibrio entre estas sub-poblaciones celulares es importante para el mantenimiento de la homeostasis inmune, las cuales se encuentran alteradas en diversas enfermedades autoinmunes, infecciosas y metabólicas [134].

- Linfocitos Th17

Las células Th17 son un subtipo de células T cooperadoras que se caracterizan por la secreción de IL17, su diferenciación es inducida específicamente por el factor de transcripción nuclear del receptor huérfano relacionado al receptor de ácido retinoico (ROR) γ t. Las células Th17 se generan en presencia de TGF β y IL6 y ejercen funciones pro-inflamatorias [135]. La función de este subconjunto de células se opone a la respuesta mediada por Tregs. Si bien, tienen vías de desarrollo recíproco, tienen efectos opuestos en la respuesta inmune. El factor de transcripción de Tregs:FOXP3 tiene un efecto inhibitorio directo sobre la diferenciación a Th17. Se ha demostrado en un modelo murino inducido por HFD un mayor número de células Th17 como así también en biopsias hepáticas de pacientes con EHNA en comparación con los controles. En consecuencia, los genes relacionados a Th17 (ROR- γ t, IL17, IL21, IL23) se encuentran incrementados en los pacientes con EHNA. En pruebas *in vitro* se observó que la IL17 contribuye sinérgicamente con los AGL para el desarrollo de esteatosis a través de la interferencia de la vía de señalización de insulina [136]. Además las citoquinas IL17 e IL23, están aumentadas en pacientes obesos y [137].

- Linfocitos B

Los linfocitos B constituyen alrededor del 6% de las células intra-hepáticas [91]. Además aumentan rápidamente en el suero y en TA de ratones alimentados con HFD, y parecen estar implicados en la IR. De manera interesante, ratones deficientes en células B alimentados HFD muestran una menor IR que los controles. Además, un aumento de la concentración sérica del factor de activación de células B (BAFF) se reportó en la EHNA humana. Los estudios pre-clínicos demostraron que ratones deficientes en el receptor de BAFF tuvieron una mejora en la IR inducida por la obesidad acompañada de una reducción de las células B, de los niveles de IgG sérica y la inflamación del TA visceral [138].

- Células supresoras mieloides

La activación de células inmunes, incluyendo macrófagos y células T CD8⁺, contribuye de manera significativa al avance de la obesidad y sus complicaciones médicas asociadas, como la aterosclerosis, EHNA, IR y diabetes tipo 2. Sin embargo poco se conoce acerca de la regulación de la respuesta *in vivo*. Se ha demostrado un incremento de células mieloides inmaduras Gr1⁺CD11b⁺ en los tejidos periféricos (hígado y TA) durante la obesidad. La disminución de estas células en animales obesos aumentó significativamente la inflamación y desmejoró la sensibilidad insulina y la tolerancia a la glucosa. Bajo condiciones de obesidad, células Gr-1⁺ suprimen la proliferación e inducen la apoptosis de las células T CD8⁺ y tienen la capacidad de favorecer la diferenciación de los macrófagos a un perfil M2 insulino-sensibles contrarrestando la respuesta pro-inflamatorias en el hígado y el TA [139].

OBJETIVOS CAPÍTULO I

GENERAL En nuestro modelo experimental de EHNA utilizando ratones machos C57BL/6 WT y TLR4^{-/-} alimentados con una dieta media en lípidos se propone:

- Investigar la influencia de la infección con *Trypanosoma cruzi* como potencial factor sinérgico de riesgo para la injuria hepática y además, ver el efecto del tipo de dieta en la evolución de la enfermedad infecciosa.

ESPECÍFICOS A distintos tiempos post infección en los 4 grupos experimentales (DC, DG, I+DC e I+DG) WT y TLR4^{-/-} se procederá a :

- Analizar el daño hepático mediante estudios histopatológicos y evaluar el perfil de proteínas de fase aguda, lípidos, lipoproteínas y otros parámetros metabólicos como glucosa e insulina, en plasma.
- Estudiar los distintos tipos celulares que participan en las lesiones hepáticas (macrófagos, granulocitos, linfocitos T, linfocitos B) y las citoquinas que producen.
- Determinar el perfil de citoquinas inflamatorias IL12, IFN γ , IL6 e IL17 y la quimiocina MCP-1/CCL2 en plasma. Demostrar la presencia de otros mediadores inflamatorios, como las especies reactivas del oxígeno (ERO) en tejido hepático. Además, se estudiará la molécula de adhesión intercelular ICAM-1, involucrada en otros modelos de EHNA.
- Estudiar la carga parasitaria hepática mediante q-PCR y ver si la misma es influenciada por el tipo de dieta.
- Analizar en hígado la población de células supresoras mieloides (CSM) y sus principales fenotipos.

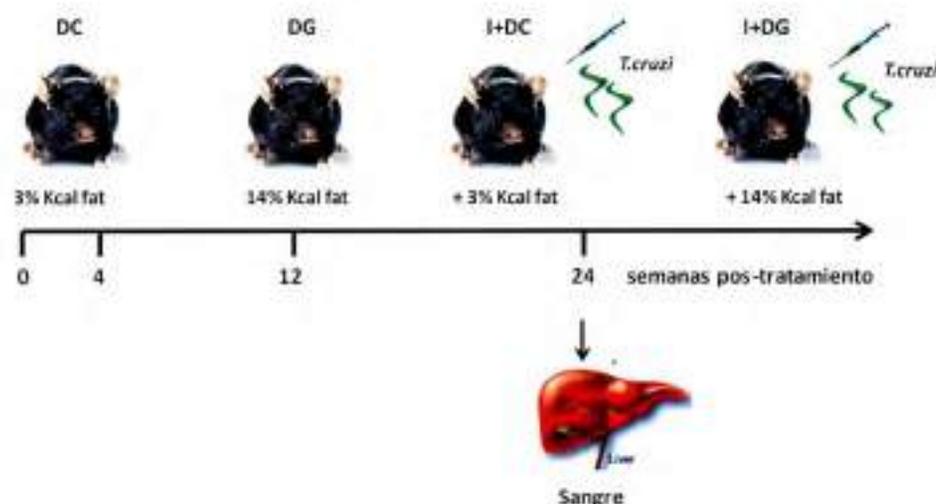
RESULTADOS CAPÍTULO I**1. Modelo experimental en ratones machos C57BL/6J WT y TLR4^{-/-}**

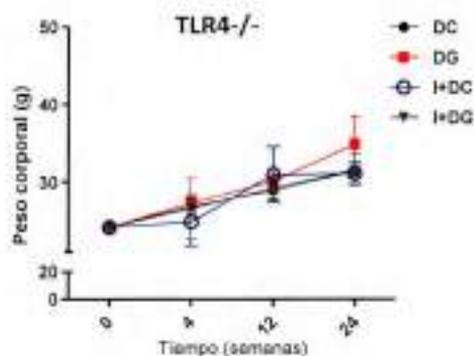
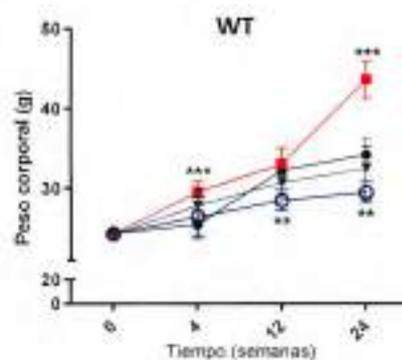
Figura 1. Diseño experimental. Animales machos C57 WT y TLR4^{-/-} de 6 a 8 semanas de edad fueron divididos en 4 grupos: 1) **DC**, dieta control; 2) **DG**, dieta media en grasas; 3) **I+DC**, infectado + dieta control y 4) **I+DG**, infectado + dieta media en grasas. Los grupos infectados fueron inyectados intra-peritonealmente con 100 tripomastigotes de la cepa Tulahuen. A las 4, 12 y 24 semanas de tratamiento se hicieron diferentes estudios.

Los grupos DG y DC no mostraron ningún signo clínico de enfermedad durante todo el período experimental, aunque el grupo DG exhibió pelaje graso desde la 2da hasta la 12va semana de tratamiento. El grupo I+DC mostró signos de enfermedad parasitaria con *T. cruzi* tales como ojos entrecerrados, pelaje erizado, reducción de la motilidad y del apetito durante el período de alta parasitemia alrededor de la 4ta semana. Posteriormente, en la fase crónica los signos clínicos fueron más difusos a excepción de la pérdida de peso. En el grupo I+DG estos signos fueron más pronunciados y aparecieron con anterioridad, a partir del día 20 post-infección hasta el final del período experimental y presentaron una mayor mortalidad y mayor parasitemia en la etapa aguda en comparación con los ratones del grupo I+DC.

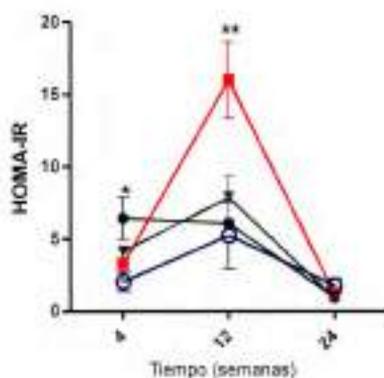
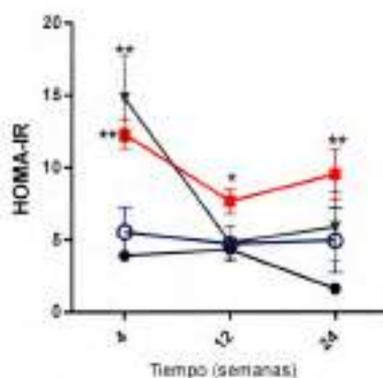
2. La infección con *T. cruzi* provoca una disminución en el peso corporal y mejora la sensibilidad a la insulina pero aumenta la concentración de triglicéridos y colesterol plasmáticos

En primer lugar, se analizaron los parámetros bioquímicos y metabólicos de los grupos experimentales (DC, DG, I+DC e I+DG) en ratones C57 WT y TLR4^{-/-}. El grupo WT alimentado con DG tuvo un incremento de peso corporal significativamente mayor ($43,5 \pm 2,3$ g) que el grupo DC ($34 \pm 1,0$ g). Por el contrario, este aumento en el peso corporal no se observó en ratones TLR4^{-/-} alimentados con DG ($33,7 \pm 2,9$ g). De manera interesante, el aumento de peso debido a DG en ratones WT se redujo significativamente por la infección con el parásito (I+DG) ($32,4 \pm 3,7$ g) (Fig. 2A). A continuación, se analizaron los niveles de glucosa y de insulina plasmáticas en todos los grupos hasta 24 semanas. El índice de HOMA-IR, una medida de la resistencia a la insulina, se muestra en la figura 2B. Este parámetro fue significativamente mayor en el grupo DG WT que en el grupo de DC WT (aproximadamente 4 veces más) y se mantuvo elevado hasta las 24 semanas. En el grupo I+DG WT, este índice se incrementó tempranamente (4 semanas) pero al final del estudio (24 semanas), se redujo en comparación con el grupo de ratones WT alimentados con DG. El análisis en ratones TLR4^{-/-} reveló un aumento de HOMA-IR en el grupo DG solamente a las 12 semanas pero a las 24 semanas los valores fueron similares en todos los grupos TLR4^{-/-}. La concentración de triglicéridos plasmáticos en el grupo DG WT fue mayor que en los otros 3 grupos WT (I+DG, I+DC y DC) a las 4 semanas. Más tarde, a las 24 semanas el nivel de triglicéridos se incrementó en todos los grupos frente al DC WT. En contraste, no hubo cambios significativos en los niveles de triglicéridos en todo el estudio comparando los diferentes grupos TLR4^{-/-} (Fig. 2C). Por otra parte, la concentración más alta de colesterol se encontró en el grupo I+DG WT respecto de los otros 3 grupos, en todos tiempos ensayados (Fig. 2D). En contraste, al comparar los grupos TLR4^{-/-}, se observó que solamente el grupo I+DG presentó elevados niveles de colesterol a las 24 semanas en comparación con DG (Fig. 2D).

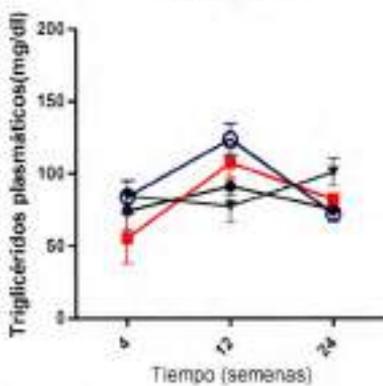
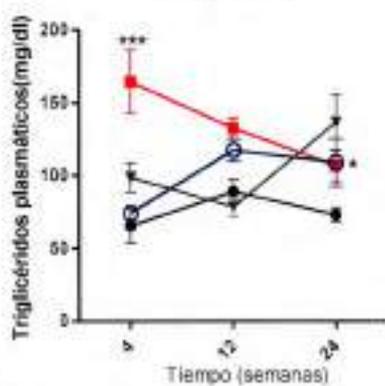
A



B



C



D

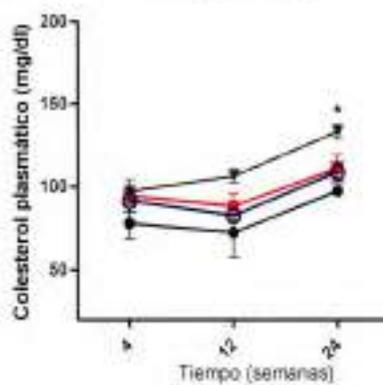
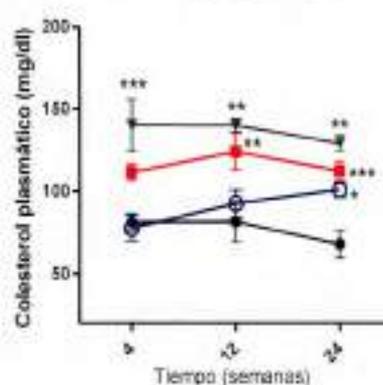
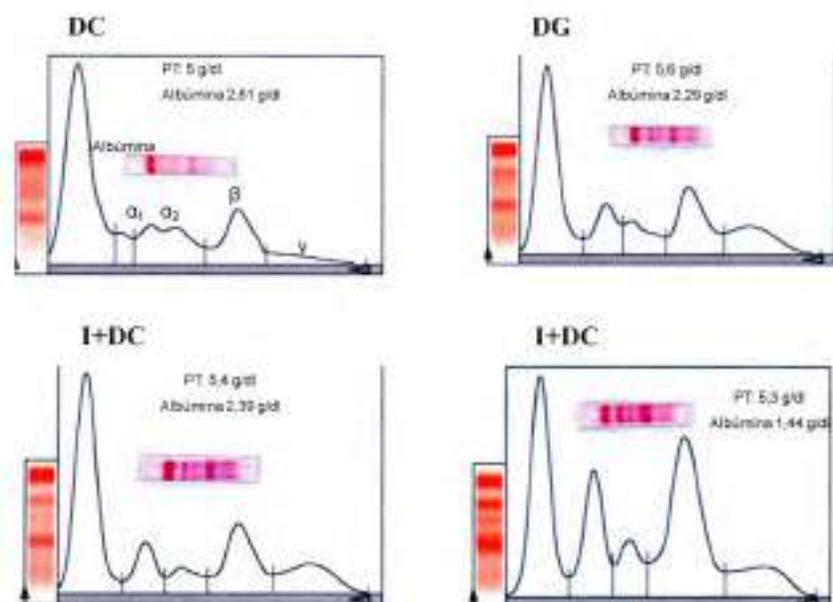


Figura 2. Cambios metabólicos asociados al sobrepeso inducido por la DG y a la infección con *T. cruzi*. Se midieron los parámetros metabólicos después de 12 h de ayuno en plasma de ratones de ambas cepas WT y TLR4^{-/-} entre los grupos: DC, DG, I+DC e I+DG a las 4, 12 y 24 semanas, incluyendo: **(A)** El peso corporal *** DG vs DC a las 4 y 24 semanas en WT; **DC vs I+DC a las 12 y 24 semanas de WT y *** DG vs I+DG a las 24 semanas en el WT. **(B)** Los cambios en el plasma HOMA-IR en ratones WT: ** DG vs DC a las 4 semanas, ** I+DC vs. I+DG a las 4 semanas y DG vs DC a las 24 semanas, * DG vs. DC a las 12 semanas; los cambios en el plasma HOMA-IR en ratones TLR4^{-/-}: * I+DC vs. DC a las 4 semanas, ** DG vs DC, I+DC y I+DG a las 12 semanas. **(C)** Las concentraciones de triglicéridos plasmáticos en grupos de ratones WT: *** DG vs DC a las 4 semanas, ** I+DG vs. DG a las 4 semanas. Las concentraciones de colesterol **(D)** de plasma de ratones WT: *** I+DC vs. I+DG a las 4 semanas; ** DG vs. DC, I+DC vs. I+DG a las 12 semanas; *** DG vs. DC a las 24 semanas, * I+DC vs. DC a las 24 semanas y ** I+DC vs. I+DG a las 24 semanas. El análisis en los grupos TLR4^{-/-}: * I+DC vs. I+DG y DG vs. I+DG a las 24 semanas. En todos los tiempos estudiados se analizaron 10 ratones para cada grupo. Los datos se muestran como media ± SEM de un ensayo representativo de tres experimentos independientes. Un valor de p < 0,05 fue considerado significativo mediante el test Two-Way ANOVA.

3. Perfil de proteínas y de lipoproteínas plasmáticas a 24 semanas

Con el objetivo de evaluar parámetros inflamatorios en la fase aguda de tratamiento en los distintos grupos WT, se analizaron las proteínas de fase aguda. Su estudio individual demostró que los grupos DG, I+DC e I+DG presentaron un aumento de las fracciones $\alpha 1$, $\alpha 2$ y β respecto al grupo DC. Los incrementos más marcados se observaron en los grupos I+DC e I+DG, siendo más notorios en el grupo I+DG respecto a DG e I+DC. Asimismo, en I+DG se pudo observar una disminución de albúmina respecto de los demás grupos. Este resultado sugiere una fuerte reacción inflamatoria aguda sistémica en este grupo de animales (Fig. 3A). A fin de analizar la distribución de lipoproteínas plasmáticas a 24 semanas de tratamiento en nuestro modelo, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. En el grupo de ratones TLR4^{-/-}, el patrón de lipoproteínas no se alteró con la dieta grasa (DG) ni la infección asociada a esa dieta (I+DG), mientras que un aumento de LDL y VLDL fue observado en los ratones WT del grupo DG y paralelamente se observó un descenso de HDL (lipoproteína de alta densidad) en el grupo I+DG (Fig. 3B). Este resultado indica que ambos estímulos, la DG y la infección parasitaria empeoran el perfil lipídico en plasma.

A



B

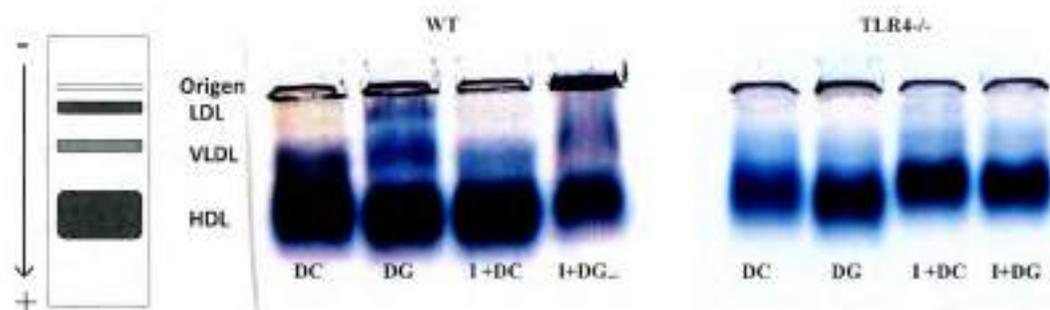
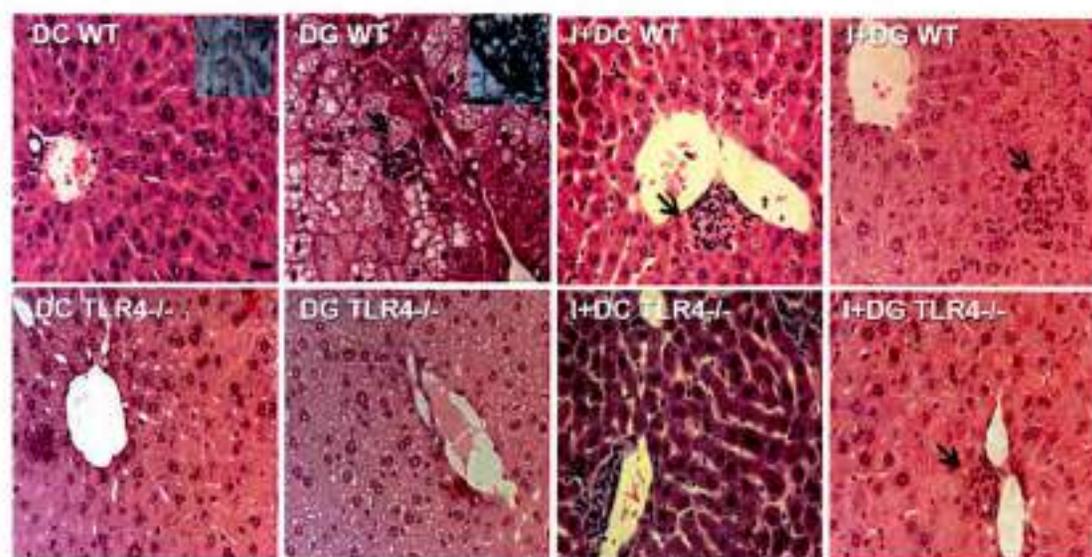


Figura 3. Distribución plasmática de proteínas y lipoproteínas en ratones WT y TLR4^{-/-} inducida por la dieta y / o infección con *T. cruzi*. (A) Se observa el perfil de las proteínas de fase aguda, identificadas por electroforesis de proteínas totales en acetato de celulosa, coloración con rojo Ponceau y evaluación por densitometría (Método automatizado) a 4 semanas de tratamiento. Las proteínas totales se cuantificaron según Biuret. (B) Se muestra el perfil de lipoproteínas plasmáticas separadas por electroforesis en gel de agarosa y tinción con Sudán Black IV, con previo ayuno de 12 hs a las 24 semanas. Se muestra una imagen representativa de 3 corridas realizadas con 3 animales por grupo.

4. La infección con *T. cruzi* reduce la esteatosis pero aumenta la inflamación hepática

Con el fin de seguir caracterizando el modelo evaluamos la histopatología hepática por coloración con H&E en cortes de tejido. Se observó que la ingesta de DG durante 24 semanas, trajo aparejada la presencia de grasa ectópica en forma de micro y macro vesículas lipídicas y también focos inflamatorios, compatibles con esteatohepatitis solamente en los ratones WT. Estos cambios morfológicos no se observaron en los ratones alimentados con DC WT ni en los grupos TLR4^{-/-}. Cabe destacar que en los grupos I+DG WT o TLR4^{-/-}, no se observaron depósitos de grasa ectópica (Fig. 4A). Estos resultados se asociaron con niveles altos de triglicéridos hepáticos y colesterol en el grupo DG WT. Sin embargo, con la infección los niveles de colesterol en el hígado fueron elevados independientemente de la dieta (Fig. 4B). Paralelamente, en los grupos TLR4^{-/-} no se hallaron cambios en estos parámetros. Además, se encontraron aumentados los LIHs en grupos infectados, ya sea WT o TLR4^{-/-}. Esta observación fue confirmada por el recuento de LIHs con la tinción con el colorante Azul de tripán (Fig. 4C). Al evaluar el daño hepático a través de la medición de AST plasmática a 4 y a 24 semanas (Fig. 4D) se observaron valores incrementados de AST en todos los grupos WT respecto del grupo DC. Es de destacar que I+DG WT presentó los mayores niveles a las 4 semanas (fase aguda de la infección).



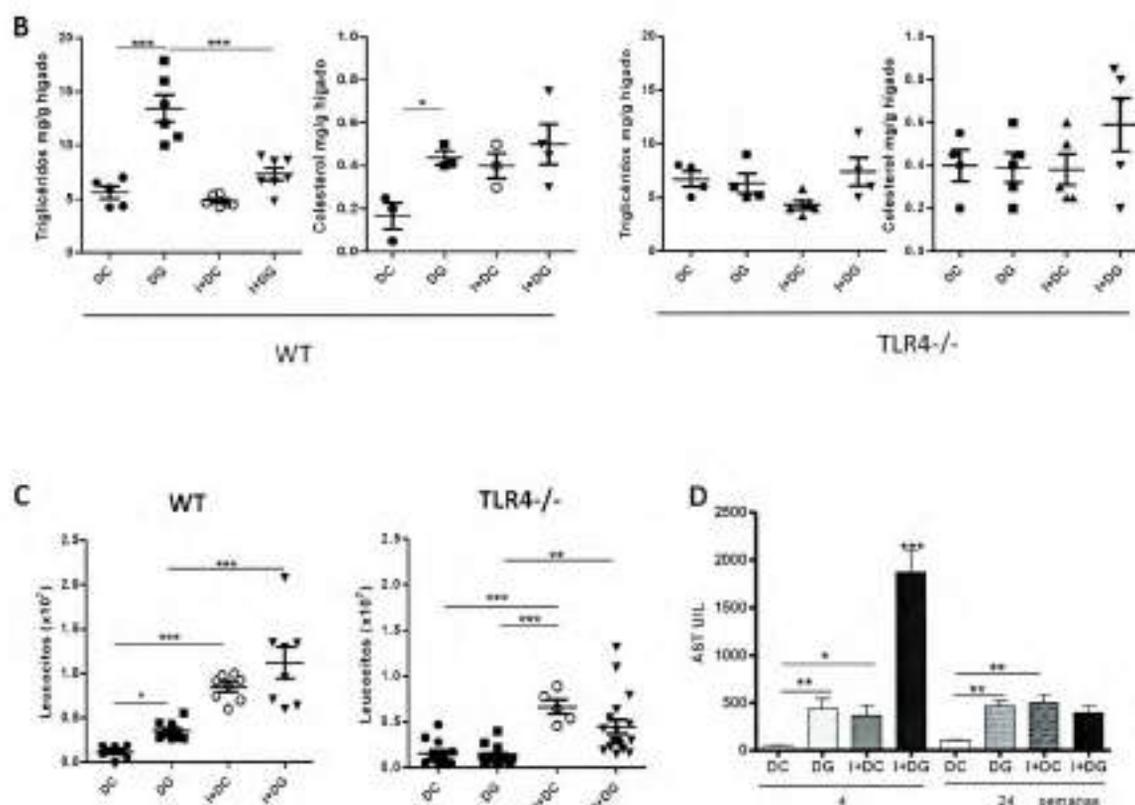


Figura 4. Inflamación hepática y esteatosis en ratones infectados o no con *T. cruzi*. (A) Secciones de tejido hepático fueron coloreadas con hematoxilina y eosina (H & E) y con Sudán Black IV (A, Inserto). Barra de escala: 20 μ m (400x). Las flechas indican focos inflamatorios, (B) El contenido hepático de triglicéridos y colesterol se determinaron y expresaron como mg/g de tejido hepático en grupos WT y TLR4^{-/-}. (C) Recuento de LIHs mediante tinción con Azul de tripan. Los números de LIHs fueron similares en ratones de ambos genotipos infectados, pero el grado de la esteatohepatitis fue significativamente mayor en los ratones alimentados con DG vs. DC WT (* $p < 0.05$). Estos resultados corresponden a muestras obtenidas a las 24 semanas (D) Determinación de AST plasmática por método enzimático de muestras obtenidas de animales WT a 4 y 24 semanas.

5. La dieta grasa y la infección con *T. cruzi* incrementan la expresión de la proteína ICAM-1 en tejido hepático

Posteriormente, se analizó la expresión de ICAM-1 debido a que es una molécula de adhesión intercelular expresada basalmente en las membranas de leucocitos y células endoteliales. ICAM-1 puede ser inducida por interleucina-1 (IL1) y TNF α . ICAM-1 es un ligando para LFA-1 (integrina), presente en los leucocitos. Estas células cuando se activan se unen a las células endoteliales a través de ICAM-1 / LFA-1 y migran a los tejidos. Como podemos ver en la figura 5 tanto la DG, como la infección y de forma más marcada conjuntamente la DG con la infección parasitaria presentaron elevada expresión de ICAM-1 en tejido hepático.

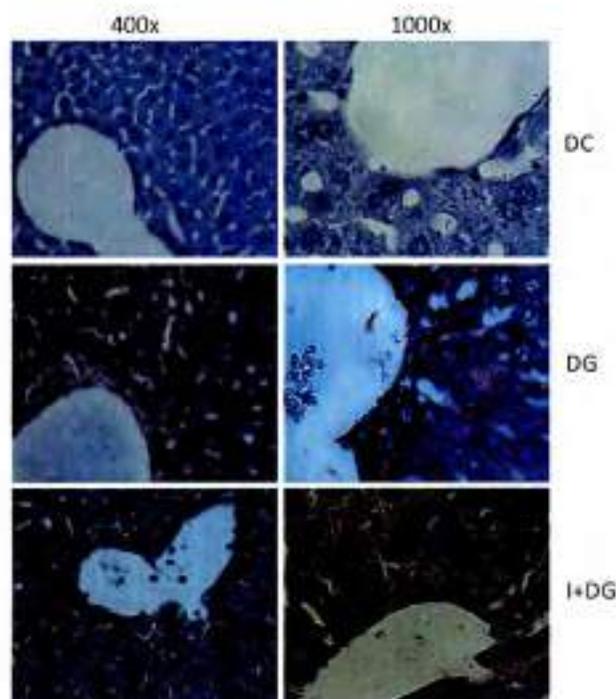
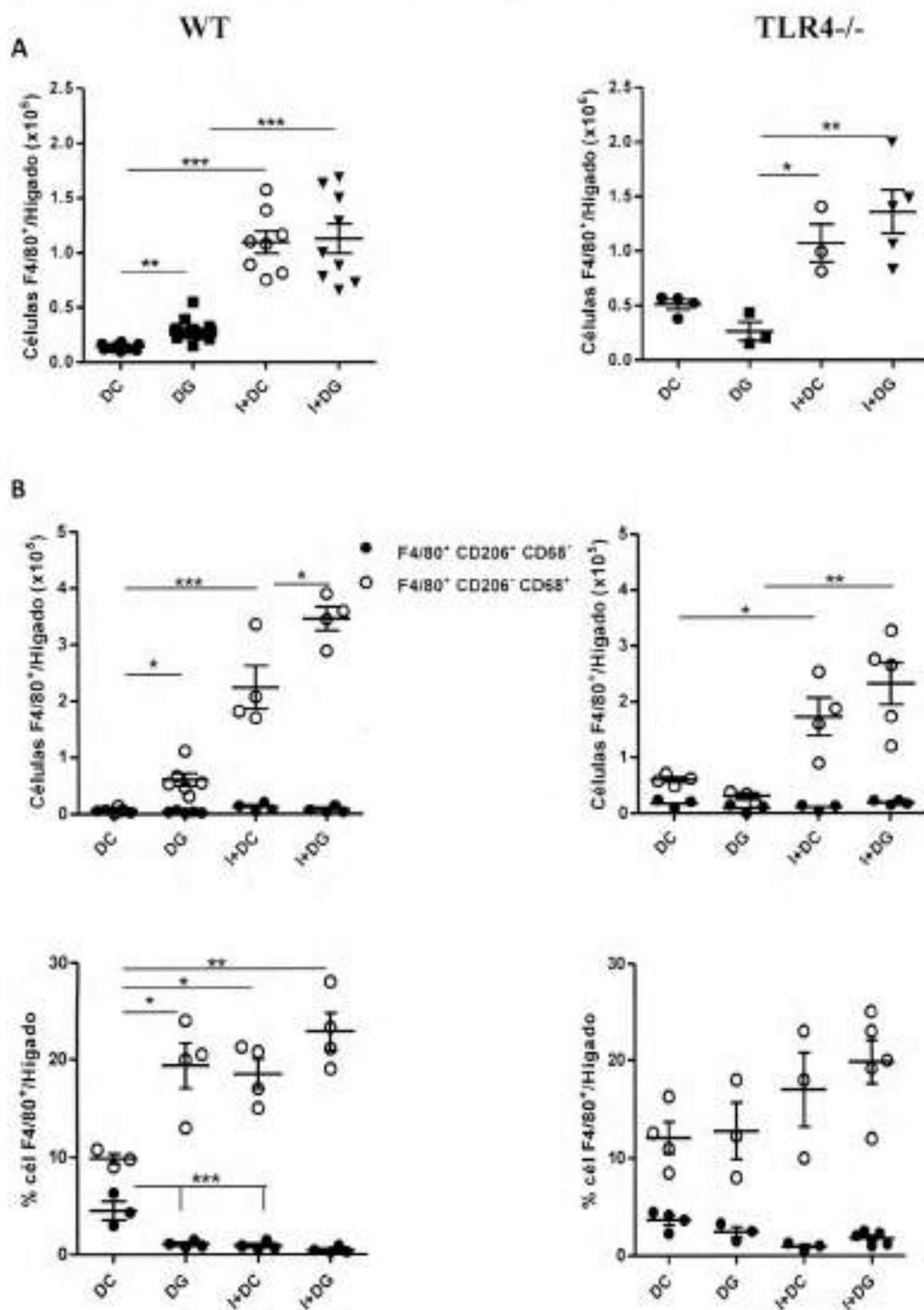


Figura 5. Expresión de ICAM-1 en tejido hepático. Inmunohistoquímica de cortes de hígado incluidos en parafina utilizando anticuerpos específicos anti-ICAM-1 de ratón en muestras obtenidas a las 24 semanas. Se muestran dos campos representativos a distinto aumento, realizado con 3 animales por grupo experimental.

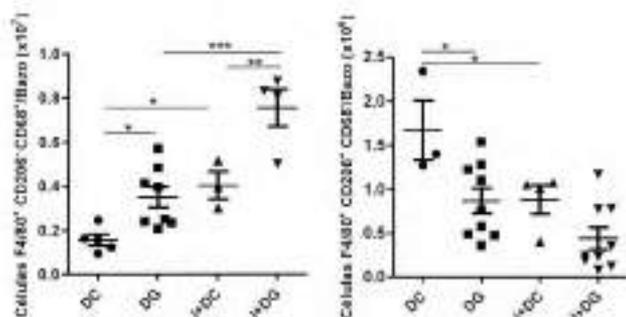
6. La infección parasitaria potencia el desarrollo de perfil inflamatorio de macrófagos M1 e incrementa la expresión del receptor CD36 en macrófagos hepáticos

Es ampliamente conocido que las células $F4/80^+$ juegan un papel crítico en la inflamación del hígado durante la esteatohepatitis. En nuestro modelo de EHNA encontramos un aumento en el número de células $F4/80^+$ en todos los grupos WT vs. DC WT a las 24 semanas. Por el contrario, no hubo cambios en el número de macrófagos hepáticos en el grupo DG TLR4^{-/-}. Sin embargo, la infección de las cepas tanto WT como TLR4^{-/-} aumentó el número de células $F4/80^+$ infiltrantes en hígado (Fig. 6A). En concordancia con estos resultados, se observó un aumento significativo del porcentaje y número absoluto de células $F4/80^+CD206^+CD68^+$ (M1). El número absoluto de células $F4/80^+CD206^+CD68^-$ (M2) fue bajo y similar entre los diferentes grupos WT, mientras que su porcentaje disminuyó en todos los grupos vs. DC WT. Por el contrario, ratones DG TLR4^{-/-} no mostraron diferencias en el número de células M1 vs grupo DC TLR4^{-/-} (Fig. 6B). A su vez, también estudiamos el fenotipo de la población $F4/80^+$ en bazo como reflejo de lo que sucede a nivel sistémico en nuestro modelo de EHNA en animales WT observando resultados similares a los encontrados en hígado de animales WT (Fig. 6C). En adición, macrófagos esplénicos de los grupos tratados presentaron mayores niveles de producción de la citoquina pro-inflamatoria IL12, siendo el más alto el grupo I+DG (Fig. 6D). Con el fin de obtener una mejor caracterización de la población de macrófagos, también incluimos en el estudio en ratones WT el marcador CD11c para discriminar las células $F4/80^+CD206^+CD11c^+$ (M1) y $F4/80^+CD206^+CD11c^-$ (M2) obteniendo resultados semejantes a los descriptos anteriormente en hígado (Fig. 6 E-F). En este sentido, se observó una alta frecuencia de células $F4/80^+CD11c^+TNF\alpha^+$ en todos los grupos WT vs. DC WT (Fig. 6F). Además, se observó un aumento en la expresión del RS CD36 en células $F4/80^+$ infiltrantes de todos los grupos WT vs. DC siendo los valores más altos obtenidos en los grupos infectados (I+DG e I+DC). Los grupos TLR4^{-/-} infectados (I+DC o I+DG) mostraron un pequeño aumento de la expresión CD36 en células $F4/80^+$, y no se hallaron cambios entre DG vs. DC TLR4^{-/-} (Fig. 6F). De manera interesante, también se demostró un aumento significativo de células $F4/80^+$ productoras de las quimiocinas CCL3/MIP-1 α y

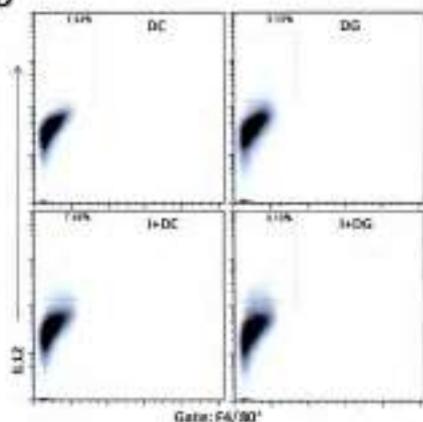
CCL2/MCP-1 sólo en la cepa WT alimentados con DG además de un incremento de F4/80⁺CCL2⁺ en grupo I+DG WT en hígado (Fig. 6G).

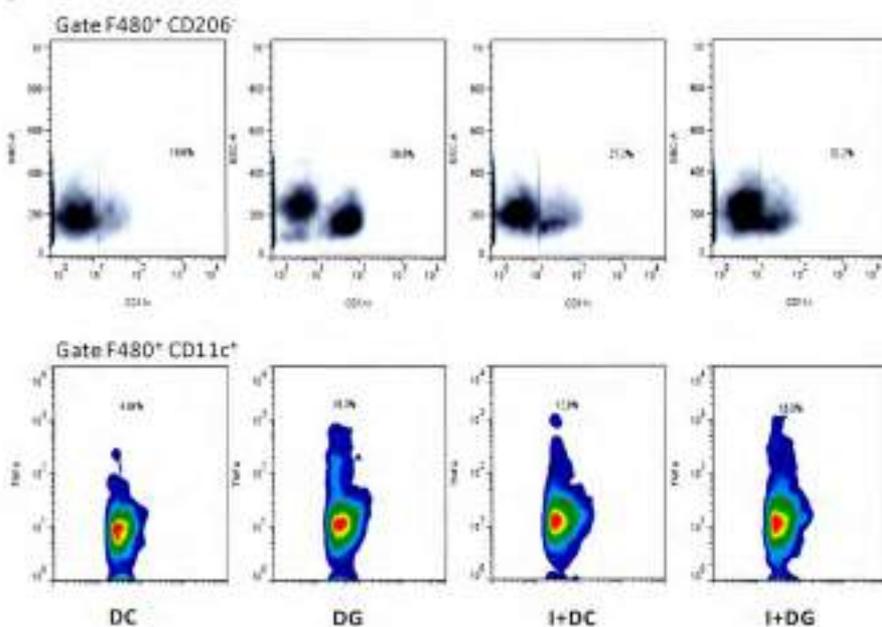


C

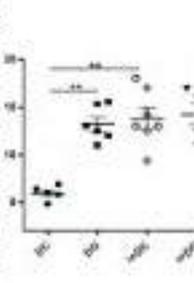


D

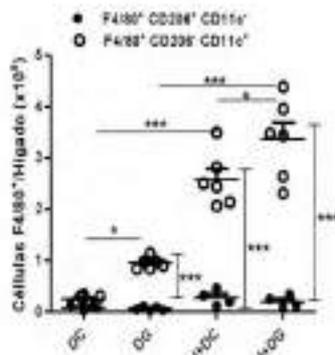
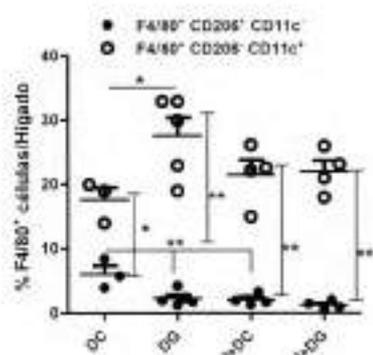




% Células F4/80⁺ productoras de TNF α



**



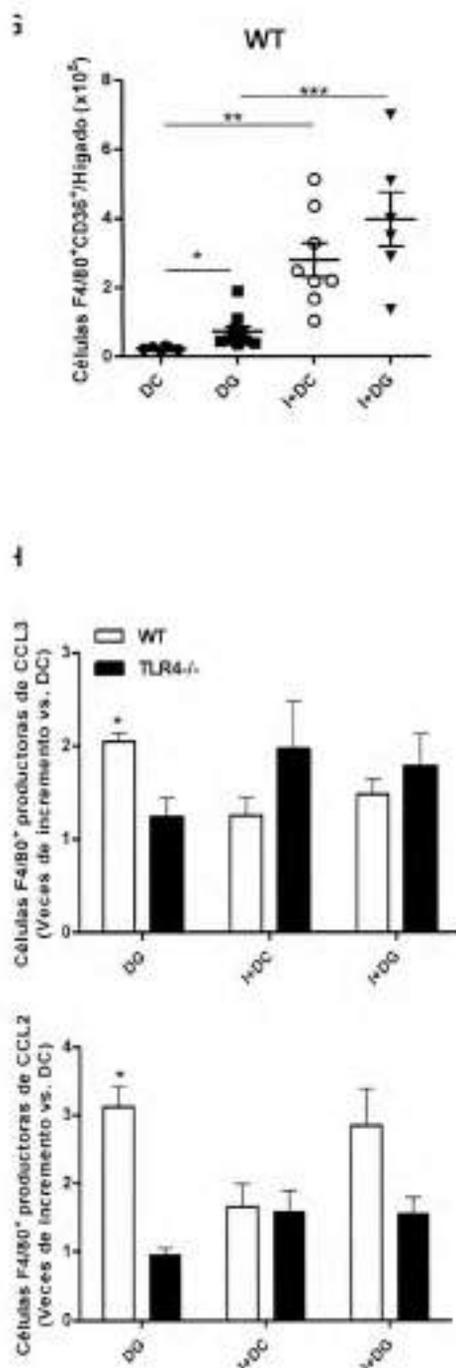
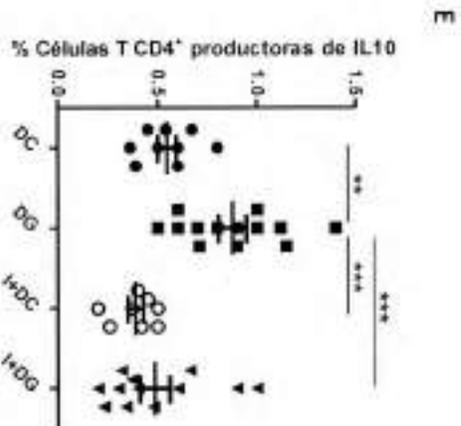
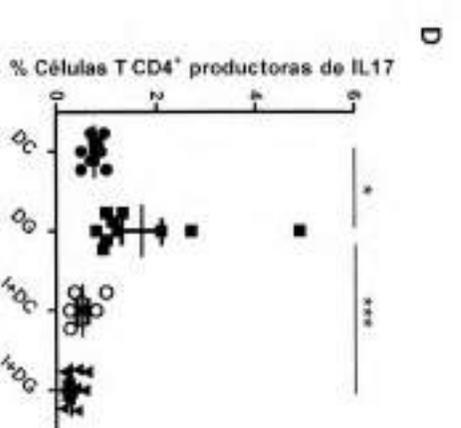
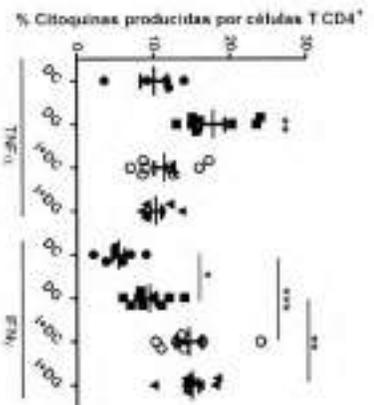
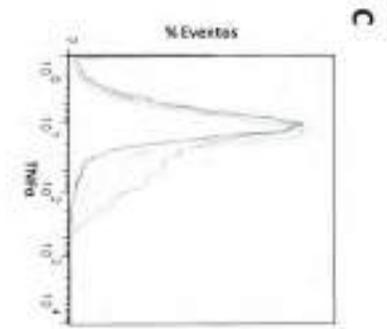
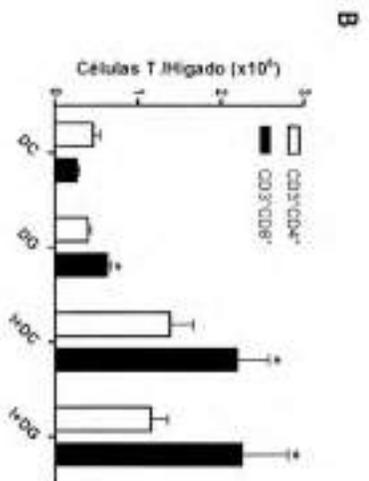
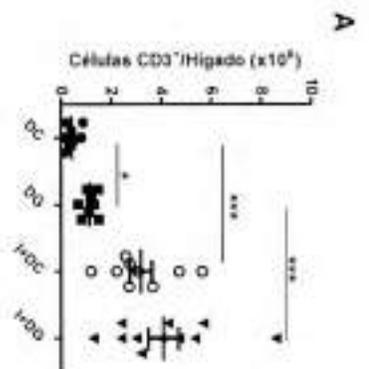
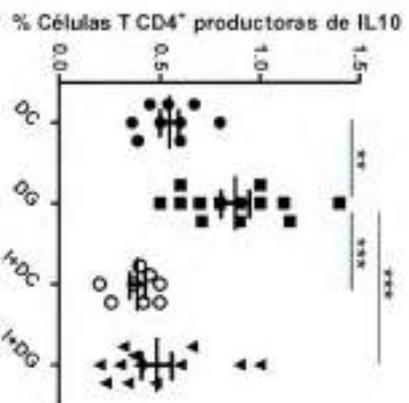
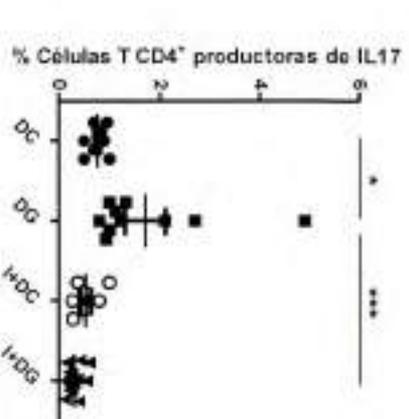
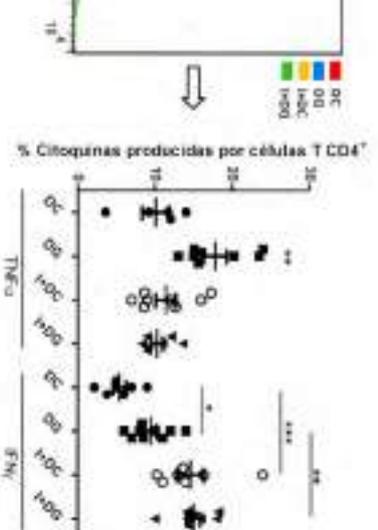
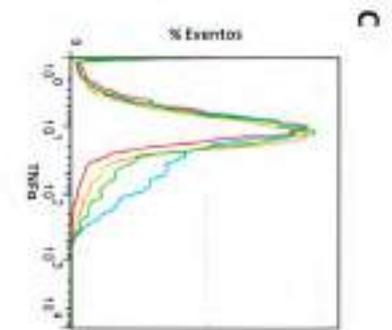
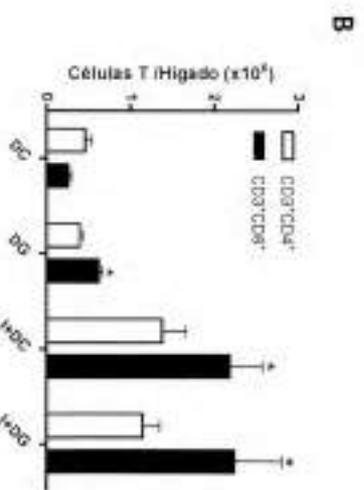
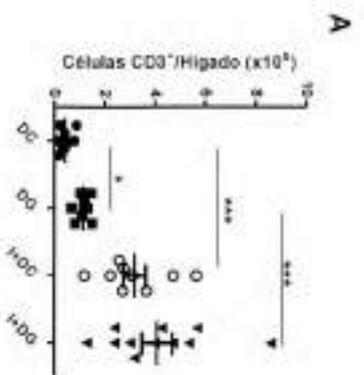


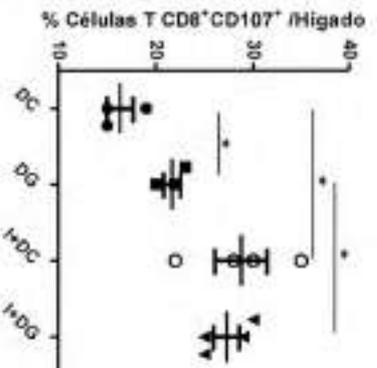
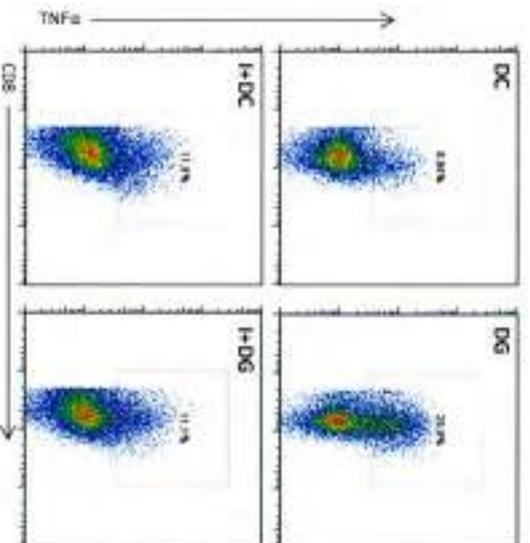
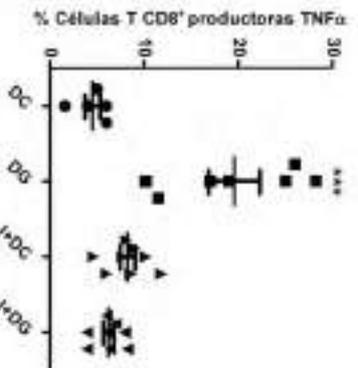
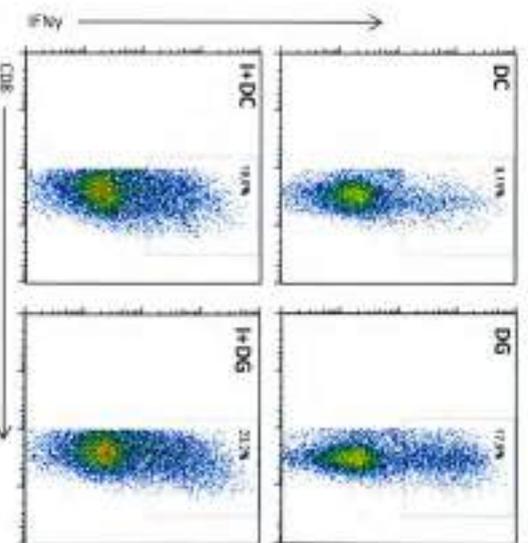
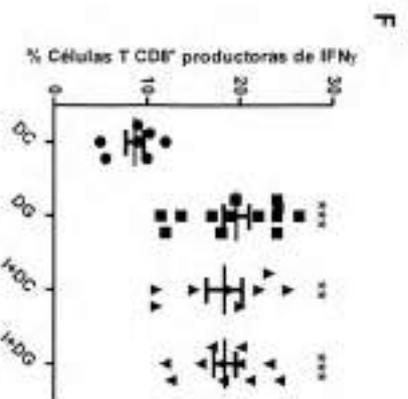
Figura 6: Expresión de marcadores M1 / M2 y del receptor CD36 en macrófagos hepáticos de ratones WT y TLR4^{-/-}. LIHs de todos los grupos de ratones fueron purificados a las 24 semanas pos-tratamiento, se tñeron con anticuerpos anti-F4/80, anti-CD206, anti-CD68, anti-CD11c, anti-CCL2, anti-CCL3, anti-TNF α y anti-IL12. **(A)** Se muestra el número absoluto de LIHs F4/80⁺ en los diferentes grupos. **(B)** Se indican el número absoluto y porcentaje de células F4/80⁺ de fenotipo M1 (CD206⁺CD68⁺) y M2 (CD206⁻CD68⁺) intra-hepáticas y **(C)** esplénicas. **(D)** Esplenocitos F4/80⁺ productores de IL12. **(E) Arriba:** Gráfico dot plot representativo de la población M1 (F4/80⁺CD206⁺CD11c⁺) de los diferentes grupos WT. **Abajo:** células M1 productoras de TNF α . **(F)** Se muestra el número absoluto y porcentaje de M1 y M2 incluyendo el marcador CD11c. **(G)** Se indica expresión de CD36, luego de hacer un gate en la región el F4/80⁺, **(H)** Porcentaje de células F4/80⁺ intra-hepáticas productoras de CCL2 y CCL3 respecto al grupo DC. Estos ensayos se realizaron por citometría de flujo con tinción intracelular para las citoquinas y quimiocinas. Los resultados se muestran como la media \pm SEM, n= 6 ratones de un experimento representativo de cuatro realizados. Un valor de p <0,05 fue considerado significativo usando el test One-Way ANOVA.

7. La infección con *T. cruzi* exagera la respuesta local de células T inducida por la dieta grasa

Considerando los antecedentes previos que citan a los linfocitos T como principales actores en el desarrollo de EHNA, principalmente el fenotipo Th1 y CD8, y a su vez son células claves para la respuesta contra el parásito *T. cruzi*, se propuso evaluar en nuestro modelo como se hallaba esta población celular de linfocitos. El análisis de LIH de animales WT a las 24 semanas mostró un elevado número de linfocitos T CD3⁺ en todos los grupos vs. DC, siendo los valores más altos en el grupo I+DG (Fig. 7A). Además, un aumento de la proporción de células CD8⁺/CD4⁺ se encontró en el grupo DG. Un aumento más marcado en ambas sub-poblaciones CD8⁺ y CD4⁺ se observó en los grupos infectados (Fig. 7B). Para caracterizar mejor el subtipo de células T cooperadoras se analizó la producción de las citoquinas características de cada perfil INF γ /TNF α e IL-17 (Th1 y Th17 respectivamente) o IL10 (fenotipo Th2) en la figura 7C-E. Se observó un elevado número de células T CD4⁺ productoras de IFN γ en todos los grupos experimentales vs. DC WT como lo muestra la figura 7C. En forma inesperada, los resultados revelaron un fuerte incremento en la producción de TNF α e IL17 por parte de células T solamente en el grupo DG WT (Fig. 7C-D). Además, las células T CD4⁺ IL10⁺ aumentaron significativamente en el grupo de DG WT vs. DC (Fig. 7E). En este sentido también se analizaron las citoquinas pro-inflamatorias INF γ /TNF α producidas por los LT CD8⁺ (Fig. 7F-G), obteniéndose los mismos resultados que en las células T CD4⁺. Finalmente, se observó un mayor porcentaje de células T CD8⁺ citotóxicas que expresan el marcador de activación CD107⁺ en todos los grupos WT vs. DC siendo más pronunciado en los grupos infectados (Fig. 7H) y la tinción intracelular para IFN γ y TNF α en dichas células se muestra en la figura 7I. De manera sorprendente, el grupo DG mostró un incremento significativo sólo en el número de células dobles positivas TNF α ⁺ e IFN γ ⁺, mientras que los grupos infectados, a demás de este incremento en células productoras de ambas citoquinas, mostraron un aumento en el número de células simples positivas para IFN γ ⁺.







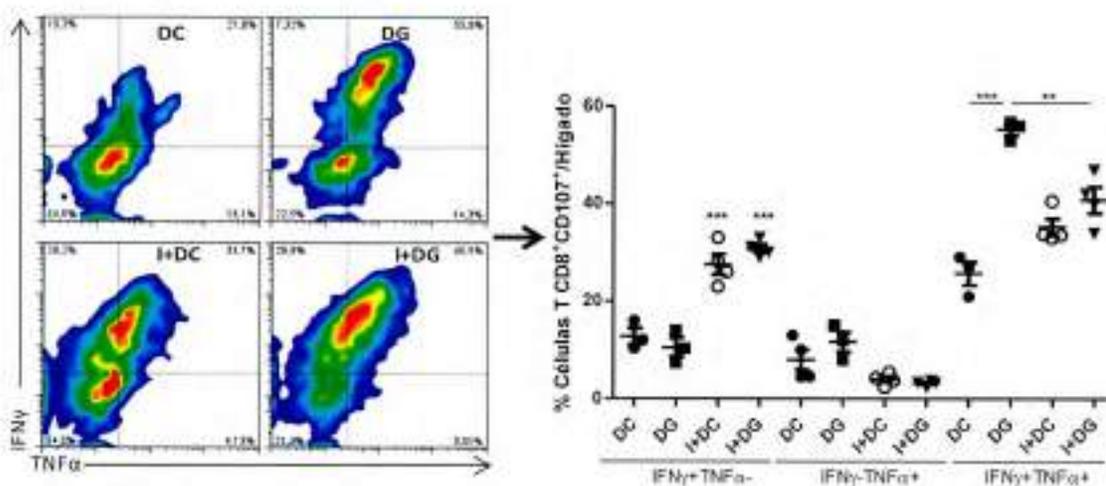


Figura 7. La respuesta local de células T inducida por DG es exacerbada por la infección con *T. cruzi*. LIHs de los diferentes grupos de ratones WT se obtuvieron a las 24 semanas y se marcaron con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-TNF α , anti-IFN γ , anti-IL17, anti-IL10, anti-CCL2, anti-CCL3 y anti-CD107 y se analizaron por citometría de flujo. (A) Se indica el número absoluto de LT CD3⁺ y (B) de CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ en LIHs. (C) Se muestra un histograma representativo mediante tinción intracelular y el porcentaje de células T CD4⁺ infiltrantes de hígado productoras de TNF α e IFN γ . (D) Porcentaje de células T CD4⁺ productoras de IL17 y (E) IL10. (F) Se indica un dot plot representativo de cada grupo que muestra LT CD8⁺ productoras de IFN γ y (G) productoras de TNF α . (H) Se muestran los porcentajes de células T CD8⁺ CD107a⁺ activadas y en (I) se muestra la producción de citoquinas (TNF α e IFN γ) por las células citotóxicas. Los datos se muestran como media \pm SEM de más de 5 ratones por grupo de un experimento representativo de tres realizados.

8. Población de células T en hígado de animales TLR4^{-/-} a 24 semanas

De acuerdo a lo esperado, no se encontraron diferencias entre los grupos DC y DG en el subtipo de células T hepáticas de animales deficientes en el receptor TLR4 (Fig. 8 A), tampoco en la producción de citoquinas intracelulares (Fig. 8B), mientras que la infección incrementó el número absoluto de LT y la producción de citoquinas pro-inflamatorias en esta cepa de ratón (Fig. 8C-D). A su vez, no se detectaron diferencias significativas en la producción de IL10 por parte de LT CD4⁺ comparando los 4 grupos TLR4^{-/-} (Fig. 8E).

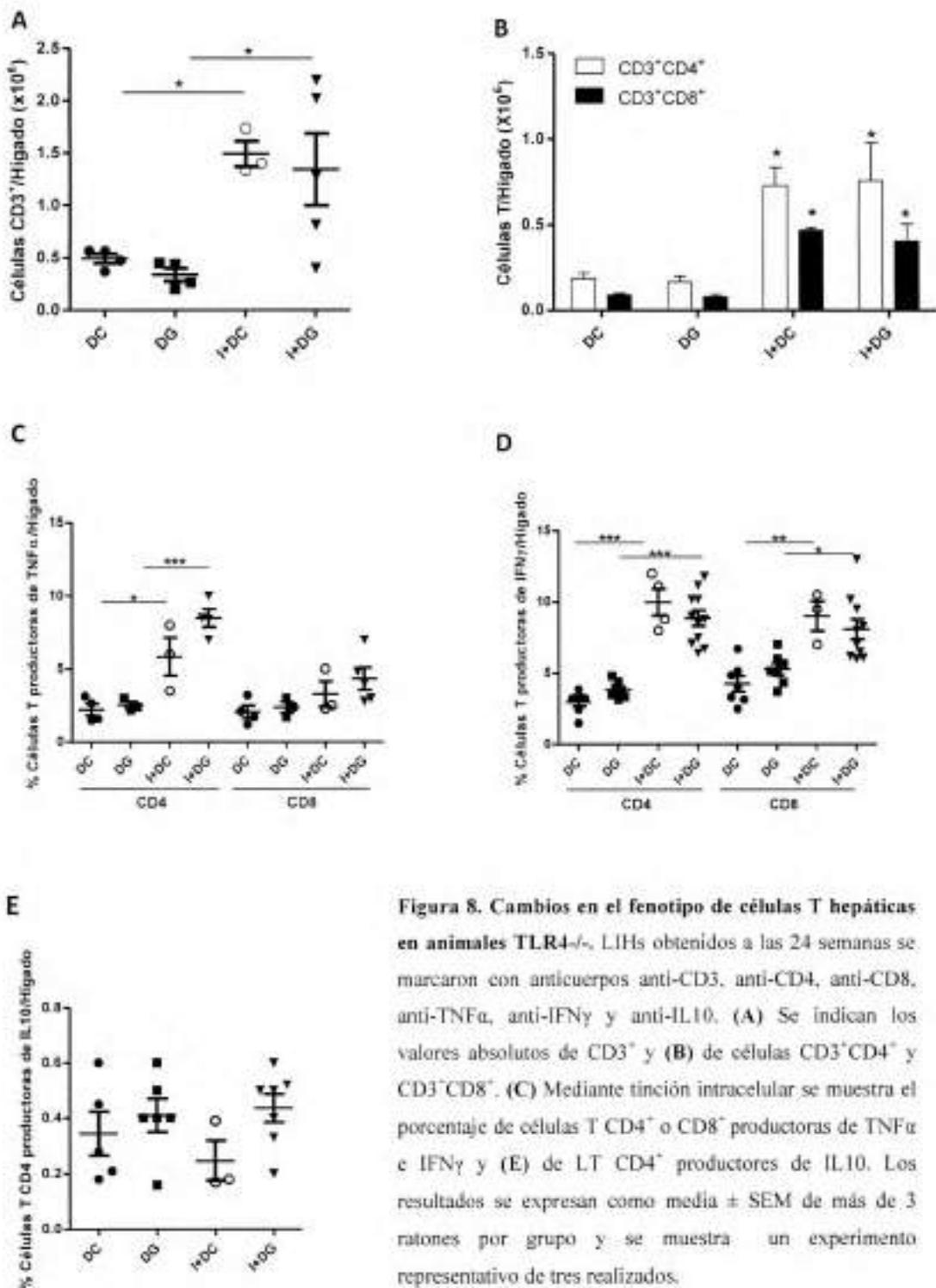


Figura 8. Cambios en el fenotipo de células T hepáticas en animales TLR4^{-/-}. LIHs obtenidos a las 24 semanas se marcaron con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-TNF α , anti-IFN γ y anti-IL10. (A) Se indican los valores absolutos de CD3⁺ y (B) de células CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺. (C) Mediante tinción intracelular se muestra el porcentaje de células T CD4⁺ o CD8⁺ productoras de TNF α e IFN γ y (E) de LT CD4⁺ productoras de IL10. Los resultados se expresan como media \pm SEM de más de 3 ratones por grupo y se muestra un experimento representativo de tres realizados.

9. Producción de quimiocinas por parte de linfocitos T intra-hepáticos de animales WT y TLR4^{-/-}

Con el objetivo de analizar la producción de quimiocinas por parte de los linfocitos T en nuestro modelo, se analizó la producción de CCL2 y CCL3, dos importantes moléculas para el reclutamiento y la activación de los monocitos/macrófagos y polimorfonucleares respectivamente. Las figuras Fig. 9 A-B muestran un aumento significativo de células T productoras de CCL2 y CCL3 sólo en grupo DG WT, sugiriendo un papel clave del receptor TLR4 en el reclutamiento de leucocitos a través de estas quimiocinas.

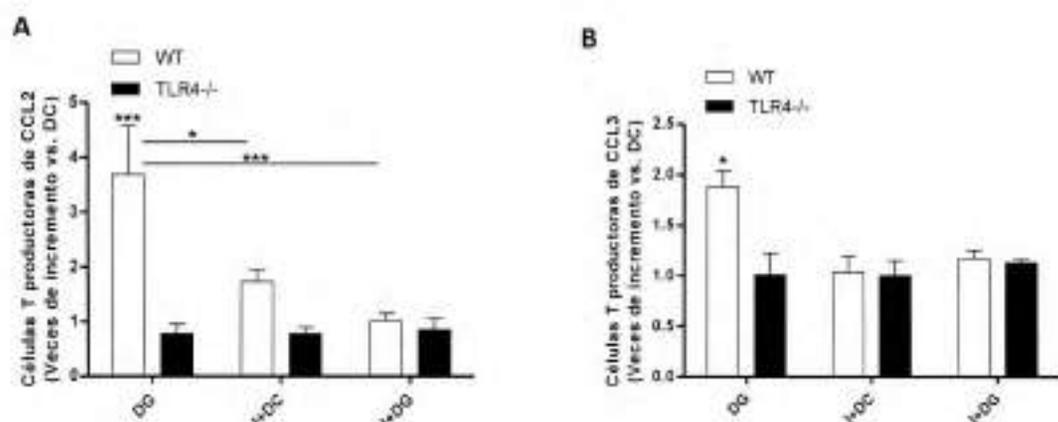
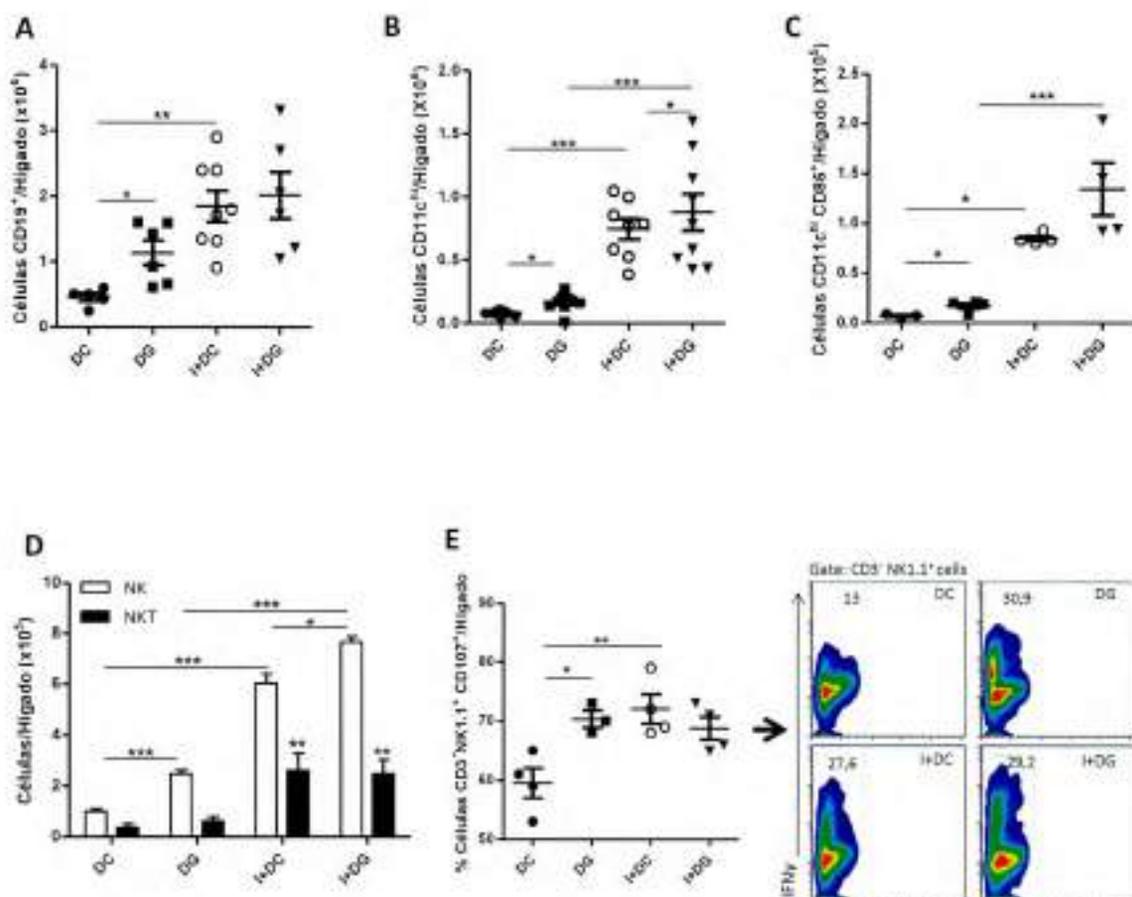


Figura 9. Las quimiocinas CCL2 y CCL3 son inducidas por la dieta grasa en animales WT. Los porcentajes de células T CD3⁺ productoras de CCL2 y CCL3 en el hígado se muestran mediante tinción intracelular (A-B). LIHs de todos los grupos se cultivaron en presencia de PMA más ionomicina y monensina durante 5 h y se marcaron con los anticuerpos correspondientes. Los datos se muestran como media \pm SEM de más de 5 ratones por grupo de un experimento representativo de tres realizados.

10. El reclutamiento de linfocitos B, células dendríticas y NK en el hígado es inducida por DG en animales WT y se ve exacerbada por la infección parasitaria

Con el fin de evaluar otras poblaciones leucocitarias que sufren cambios en distintos modelos de EHNA reportados y son importantes en la respuesta contra el *T. cruzi*, se observó en nuestro modelo un incremento en el número de células CD19⁺ (células B),

NK1.1⁺ (NK), CD11c^{high}CD86⁺, (CDs maduras) en el hígado de los ratones alimentados con DG vs. DC WT (Fig.10A-D). Estos efectos fueron más pronunciados en los ratones infectados (I+DC e I+DG WT). Por otro lado, las células NK1.1⁺CD3⁺ (NKT) se incrementaron solamente en los grupos infectados WT. Además, las células NK productoras de IFN γ mostraron un fenotipo activado CD107⁺ en todos los grupos experimentales WT vs. DC (Fig.10E). En este sentido, en ratones DG TLR4^{-/-} no se observaron diferencias entre los grupos (Fig.10F), lo que demuestra el papel clave de TLR4 en este modelo esteatohepatitis. Sin embargo, los grupos infectados TLR4^{-/-} mostraron un aumento en el número de células B, NK y NKT respecto sus controles.



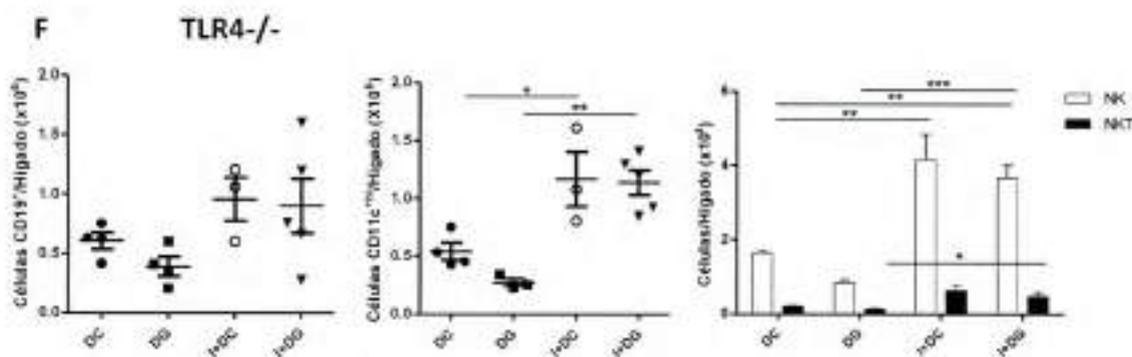
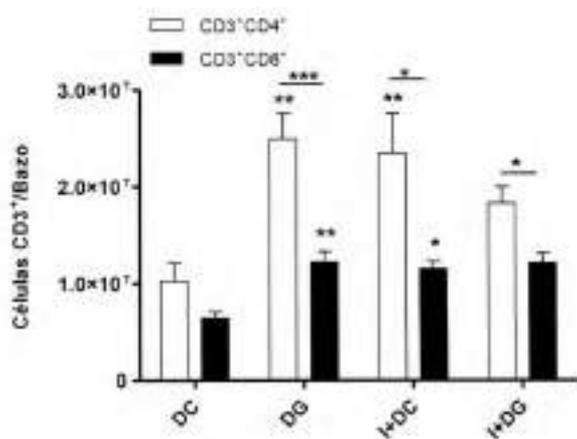
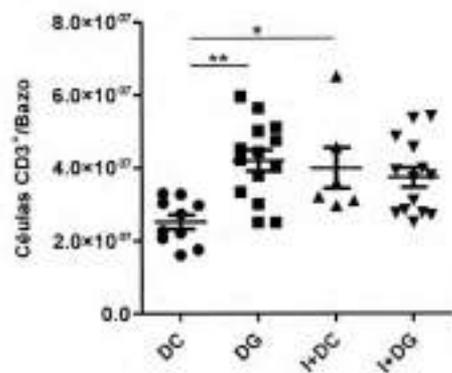


Figura 10. El reclutamiento de linfocitos B, células dendríticas y células NK en el hígado WT es inducido por la dieta grasa y aumentado por la infección parasitaria. LIHs de diferentes grupos de ratones fueron teñidas con anticuerpos anti-CD19, anti-CD11c, anti-CD86, anti-CD3, anti-NK1.1, anti-CD107 y anti-IFN γ . **(A)** Se indican las cifras absolutas de células CD19⁺, **(B)** el número absoluto de CD11⁺ y **(C)** CDs que expresan la molécula co-estimuladora CD86, **(D)** el número absoluto de células NK y NKT, **(E)** Se muestran el porcentaje de células CD3⁺ NK1.1⁺ CD107a⁺ productores de IFN γ . LIHs de todos los grupos se cultivaron en presencia de PMA más ionomicina y monensina durante 5 h y se tificaron con anticuerpos correspondientes. **(F)** Cambios en el número absoluto de células B, CDs, NK y NKT en la cepa TLR4^{-/-}. Los datos se muestran como media \pm SEM de más de 4 ratones por grupo de un experimento representativo de tres realizados con la cepa WT y de dos realizados con la cepa TLR4^{-/-}.

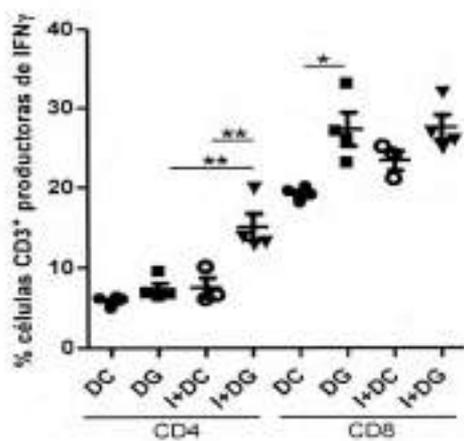
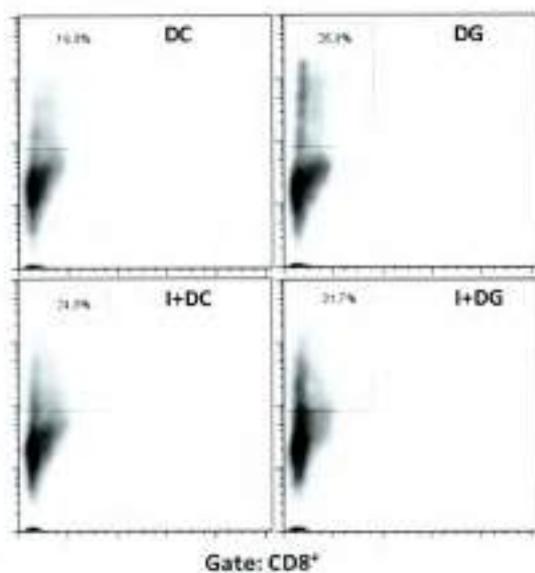
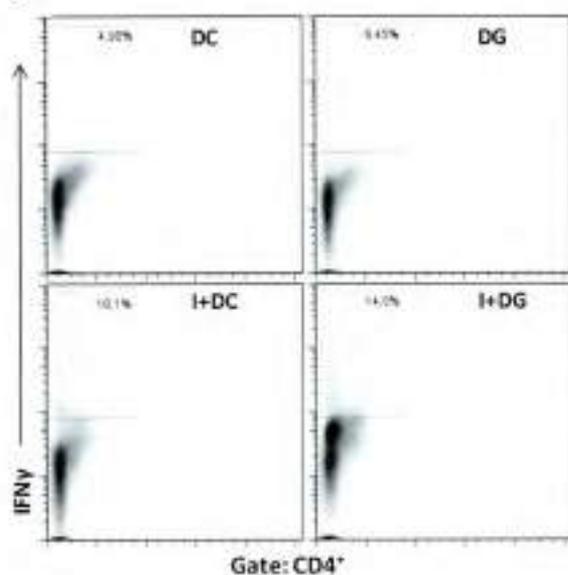
11. Estudio de células de la inmunidad adaptativa en bazo

Como reflejo a nivel sistémico, se propuso estudiar en el bazo las poblaciones que comandan la respuesta inmune adaptativa de los animales tratados. En la figura **IIA** vemos que hay un incremento significativo de células T respecto al grupo DC. Sin embargo este aumento no alteró la relación CD8/CD4. Al evaluar la producción de IFN γ por las células T de bazo (Fig. **IIIB**) podemos observar que a nivel de células CD4⁺ el estímulo dado por la infección como así también el desbalance en el metabolismo de lípidos y desarrollo de DAMPs genera un aumento significativo sólo en el grupo I+DG, mientras que para las células CD8⁺ hay un aumento de la misma en todos los grupos siendo significativo el estímulo de la DG. También evaluamos como se encuentran las CDs (Fig. **IIIC**) y los LB (Fig. **IIID**) en nuestro modelo en bazo. Pudimos observar al igual que en hígado un incremento en el número absoluto de ambas poblaciones en los grupos tratados.

A



3



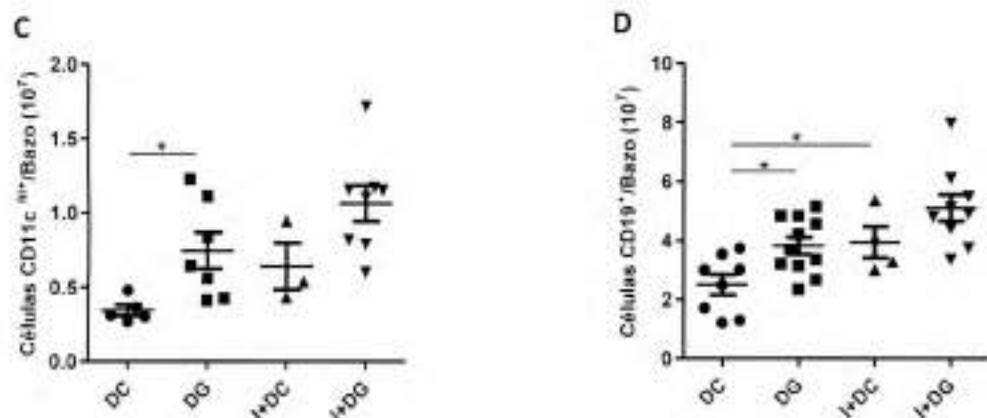


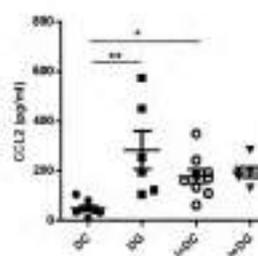
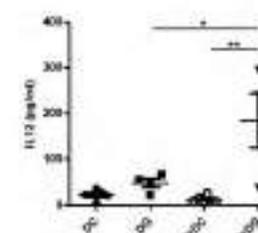
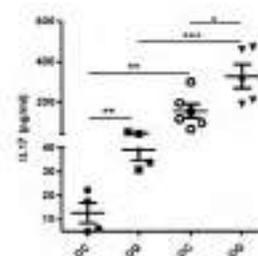
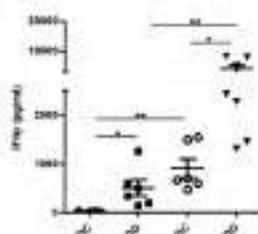
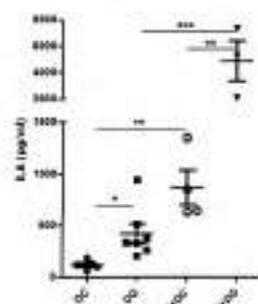
Figura 11. Poblaciones de LT, CDs y LB esplénicas en animales WT tratados a las 24 semanas. Se purificaron leucocitos de bazo de todos los grupos de ratones WT, se los marcó con los respectivos anticuerpos y luego se les ensayó citometría de flujo. **(A)** Número absoluto de células CD3⁺ y de LT CD4⁺/CD8⁺. **(B)** Producción de IFN γ por LT CD4 y CD8 esplénicos. Para ello, leucocitos de bazo purificados fueron estimulados *in vitro* con PMA y Ionomicina 1 h, más 4 hs con Monensina, luego se los marcó con los anticuerpos correspondientes y se les ensayó citometría de flujo. **(C)** Número absoluto de células CD11c^{hi} y de **(D)** LB con el marcador de población CD19. Se muestra la estadística mediante el test One-Way Anova y un dot plot representativo de 2 experimentos ensayados.

12. La cascada de citoquinas inflamatorias a nivel sistémico es altamente dependiente de la señalización mediada por TLR4

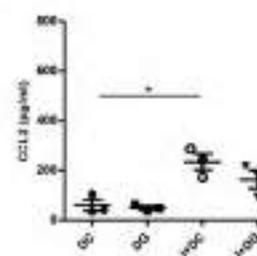
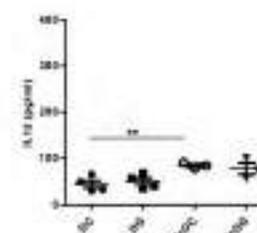
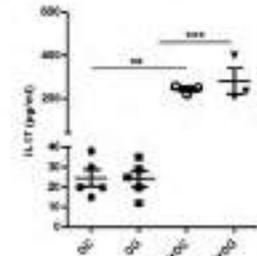
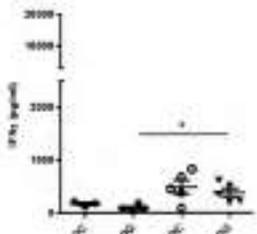
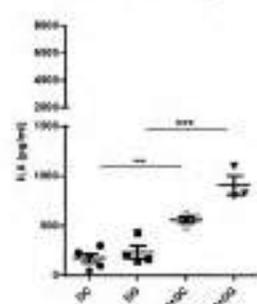
La acumulación de lípidos, su posterior lipotoxicidad y la infección parasitaria gatillan vías de señalización intracelular que conducen a la producción de citoquinas pro-inflamatorias y quimiocinas. En el modelo de steatohepatitis aquí descrito, se detectaron altos niveles de citoquinas inflamatorias en plasma, tales como IL6, IL17, IFN γ , IL12 y la quimiocina CCL2 en todos los grupos experimentales WT vs DC a las 24 semanas; observándose los niveles más altos de IL6 e IFN γ en I+DG vs DG (alrededor de 100 veces mayor) (Fig. 12A y C). Además, la citoquina anti-inflamatoria IL10 solamente se detectó en el plasma del grupo DG WT (Fig. 12E), resultado coincidente con lo que sucede a nivel local en hígado. Como era de esperar, las concentraciones de citoquinas inflamatorias fueron muy bajas en el plasma de ratones TLR4^{-/-} infectados en comparación con sus respectivos controles WT (Fig. 12B y D). Del mismo modo, el grupo DG TLR4^{-/-} no mostró diferencias en comparación con el grupo DC TLR4^{-/-}.

A

WT



B

TLR4^{-/-}

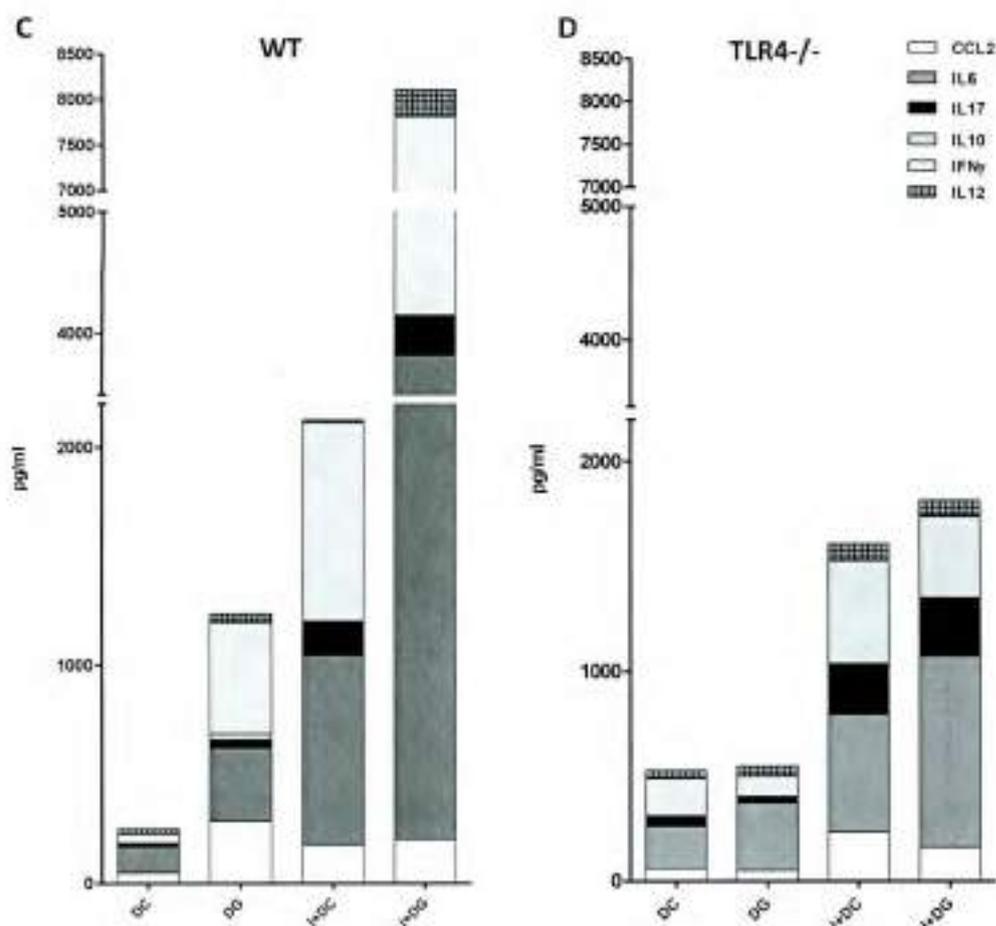
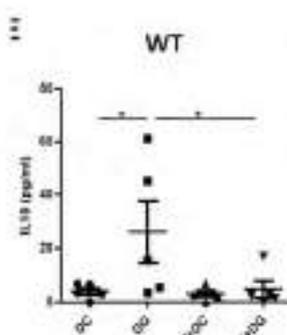


Figura 12. La cascada de citoquinas inflamatorias sistémicas es altamente dependiente de la señalización de TLR4 y es exacerbada por la infección con *T. cruzi*.

(A-D) La producción de citoquinas se cuantificó por ELISA en plasma obtenido a las 24 semanas. (C y D muestran un resumen de los gráficos de citoquinas mostrados en A y B). (C) WT CCL2: **DG vs. DC, *I+DC vs. DC; IL6: *DG vs. DC, **I+DC vs. DC, ***DG vs. I+DG y **I+DC vs. I+DG; IFN γ : *DG vs. DC, **I+DC vs. DC, **I+DG vs. DG y *I+DC vs. I+DG; IL17: **DG vs. DC, **I+DC vs. DC, ***DG vs. I+DG y *I+DC vs. I+DG; IL12: *I+DG vs. DG, **I+DG vs. I+DC. (D) TLR4^{-/-} CCL2: *I+DC vs. DC; IFN γ : *I+DG vs. DG; IL17: **I+DC vs. DC y *** I+DG vs. DG; IL12: *I+DC vs. DC. Todos los datos se muestran como media \pm SEM. Se usaron entre seis y ocho ratones por grupo y se muestran los resultados de un experimento representativo de dos realizados. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo mediante el uso del test One-Way ANOVA.



13. Cinética de la producción sistémica de la citoquina IL6 en la steatohepatitis experimental y este desorden metabólico asociada a la infección parasitaria

Debido a que la IL6 es una citoquina secretada por los macrófagos y células T, dos poblaciones altamente implicadas en ambas patologías, además de ser producida por células endoteliales y fibroblastos; y dado a que su liberación está inducida por la IL1 β y se incrementa en respuesta a TNF α , nos propusimos medir su concentración plasmática en los distintos grupos experimentales a distintos tiempos. Como se puede observar en la siguiente figura a 12 y 24 semanas de tratamiento todos los grupos experimentales tienen mayores y significativos valores plasmáticos de IL6 vs. su respectivo control, siendo el grupo I+DG el que mayores niveles presenta a 24 semanas.

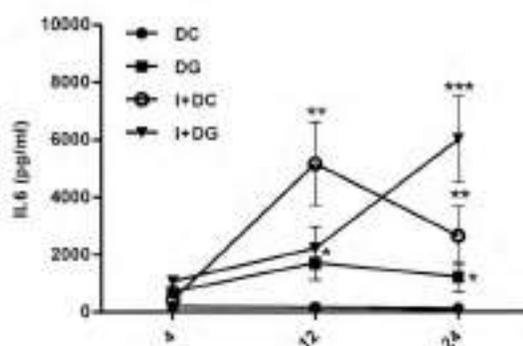
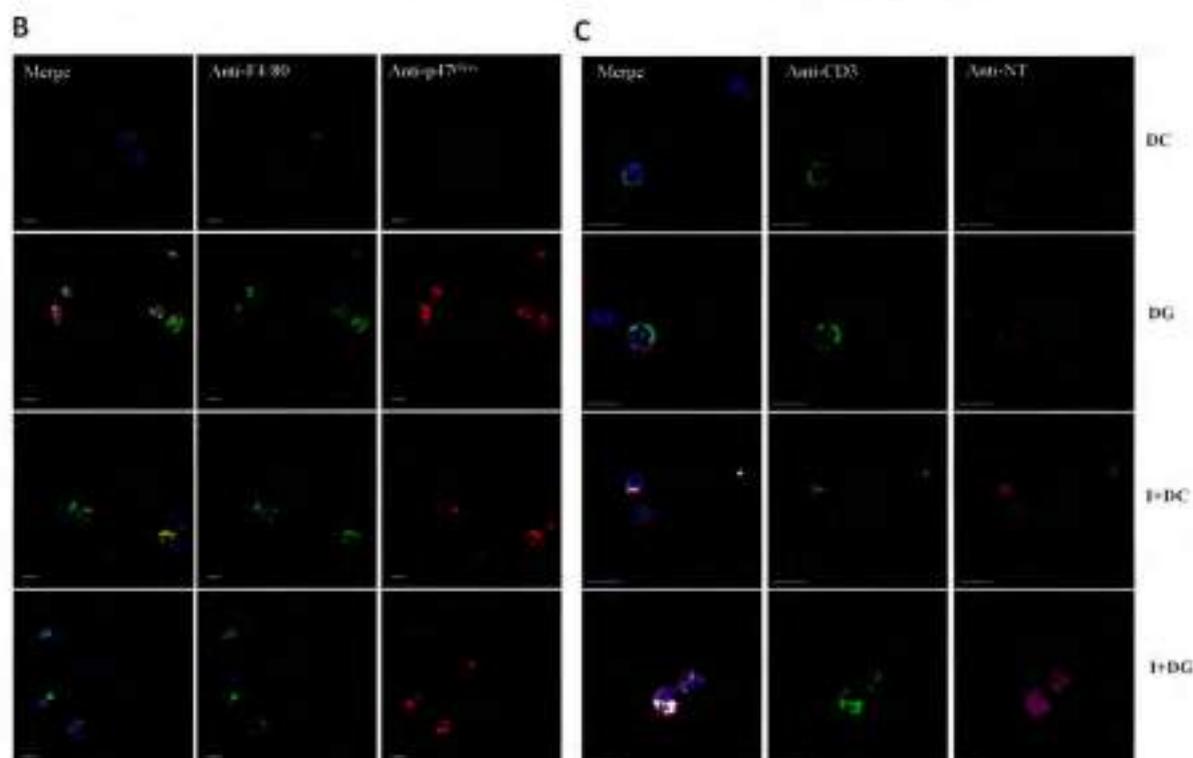
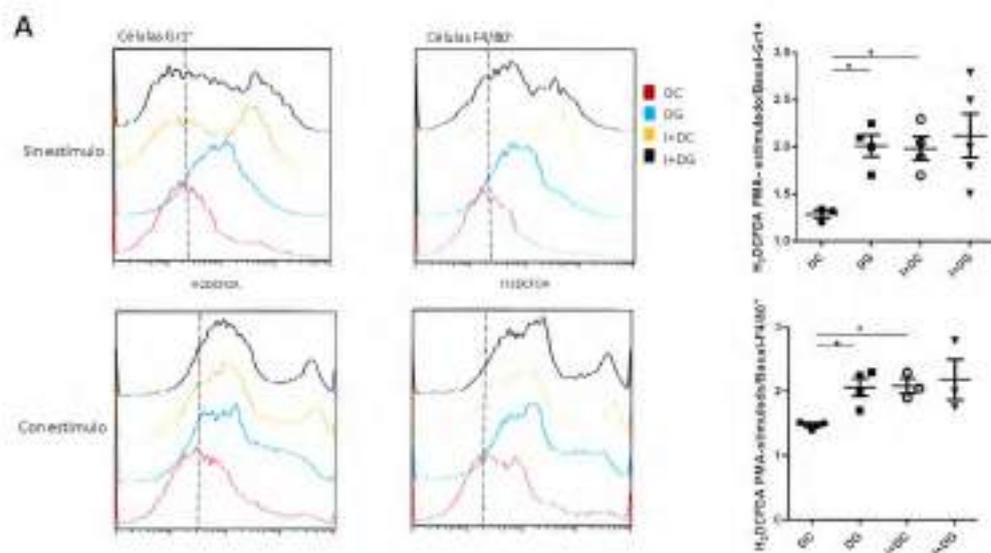


Figura 13. Niveles de IL6 a 24 semanas post-tratamiento es exacerbada por la infección parasitaria. Los niveles plasmáticos de IL6 de animales WT: DC, DG, I+DC o I+DG se cuantificaron por ELISA a las 4, 12 y 24 semanas. 12 semanas: **I+DC vs. DC, *DG vs. DC, 24 semanas: ***I+DG vs. DG, **I+DG vs. I+DC, **I+DC vs. DC, *DG vs. DC. Todos los datos se muestran como media \pm SEM y se utilizó Two-WayANOVA test. Se usaron entre seis y ocho ratones por grupo y se muestran los resultados de un experimento representativo de dos realizados.

14. La infección parasitaria exagera la producción de especies reactivas de oxígeno y peroxinitritos por leucocitos inflamatorios intra-hepáticos inducidos por la dieta grasa

Teniendo en cuenta el papel de los macrófagos y los linfocitos T como células *pivot* en el desarrollo de la esteatohepatitis y a su vez, en la enfermedad provocada por *T. cruzi*, se evaluó la producción de ERO por parte de LIH F4/80⁺ y Gr1⁺ comparando las señales fluorescentes que emite la sonda H₂DCFDA mediante citometría de flujo, con el propósito de analizar los mecanismos microbicidas utilizados por dichas células. Los resultados reflejan una mayor producción ERO en leucocitos de los diferentes grupos comparados con el grupo DC WT, estimuladas o no con PMA, ya que es conocido que la estimulación previa con PMA amplifica este efecto (Fig. 14A). Además, teniendo en cuenta que las ERO pueden ser producidas por diferentes vías, pero que en leucocitos la principal fuente es el complejo multi-enzimático NADPH oxidasa, se analizó por microscopía confocal la expresión de p47^{phox} citoplasmática, una de las subunidades del complejo de la NADPH oxidasa (Fig. 14B), donde se puede observar un aumento de p47^{phox} en los grupos tratados vs. DC WT. Además, se demostró una alta expresión de nitración de residuos tirosina en la superficie de las células T por inmunofluorescencia (Fig. 14C). Es de destacar que la marca fue más prominente en leucocitos del grupo I+DG WT; lo que sugiere que los peroxinitritos, causantes de dicha nitración, también podrían contribuir a la lesión hepática además de las ERO (Fig. 14D). De manera interesante, estos resultados se asociaron con una alta expresión de FasL en linfocitos CD3⁺ intra-hepáticos de todos los grupos experimentales comparados con el grupo DC (Fig. 14E), posiblemente revelando una mayor apoptosis de células hepáticas que estarían expresando FAS.



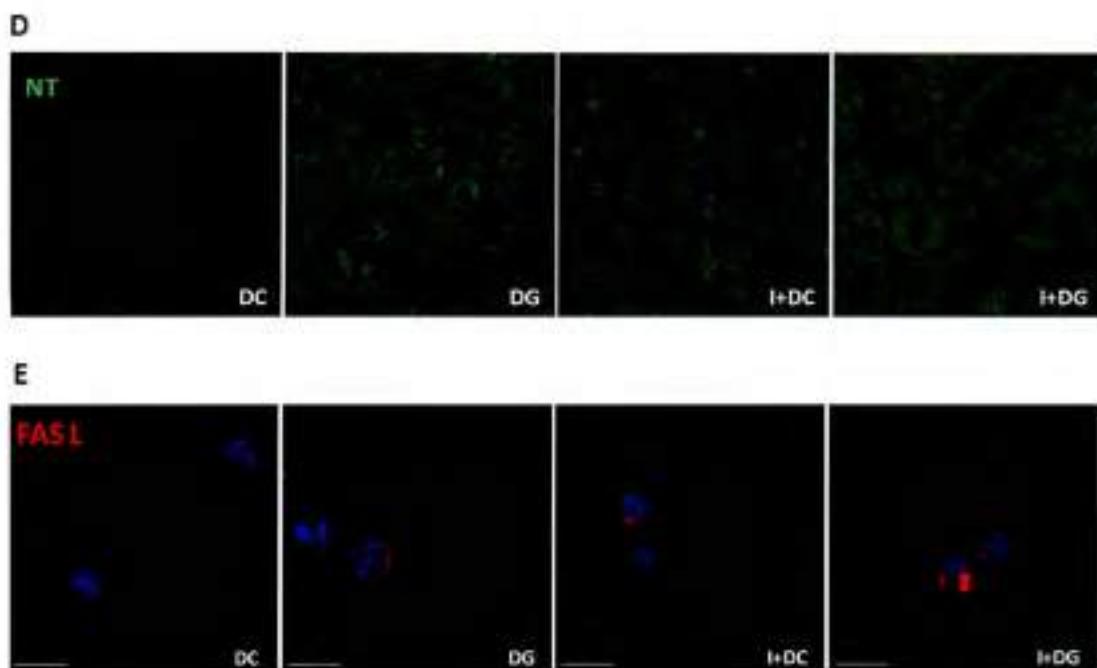


Figura 14. Leucocitos inflamatorios intra-hepáticos inducidos por la dieta grasa producen especies reactivas del oxígeno y peroxinitritos, metabolitos que se exacerbaban por la infección con *T. cruzi*. (A) LIHs de todos los grupos WT fueron cultivados en presencia o ausencia de PMA (30 mg/ml) y se incubaron con la sonda H_2DCDFA (10 μM) durante 30 minutos a 37° C. Luego fueron marcados con los anticuerpos anti-Grl o anti-F4/80. El porcentaje de células Grl⁺ y F4/80⁺ productoras de ERO se midió por citometría de flujo y los resultados se muestran como la media \pm SEM de más de tres ratones por grupo de un experimento representativo de dos realizados. (B) Expresión de p47^{phox} en células F4/80⁺. LIHs de los diferentes grupos de ratones fueron estimulados con Con A por 48 hs y luego marcados con los anticuerpos anti-F4/80 FITC, anti-p47phox/Alexa Fluor 555 y el colorante Hoesch para identificar los núcleos. Luego se visualizaron con microscopía confocal. (C) Expresión de la nitración de tirosina en las células T. LIHs de diferentes grupos de ratones estimuladas con Con A 48 hs y luego marcadas con los anticuerpos anti-CD3 FITC, anti-NT/Alexa Fluor 647 y Hoesch se visualizaron mediante un microscopio confocal Olympus FV300. Barra de escala = 10 μm .

15. La dieta media en grasas conduce a una mayor carga de parasitaria en hígado

Debido a la fuerte respuesta inflamatoria a nivel local y sistémica que encontramos en el grupo I+DG, se investigó si la parasitemia y/o carga parasitaria hepática son influenciadas por el tipo de dieta. La parasitemia fue detectada hasta el día 38 después de la infección, y fue mayor en el grupo I+DG que en I+DC (Fig. 15A). Teniendo en cuenta que la parasitemia resultó indetectable en la fase crónica, se realizó un q-PCR, pudiendo observar un aumento significativo en la carga hepática de ADN de *T. cruzi* en los animales I+DG vs. I+DC (Fig. 15B). Estas observaciones revelaron que la dieta es un factor clave en la carga parasitaria y lesión hepática.

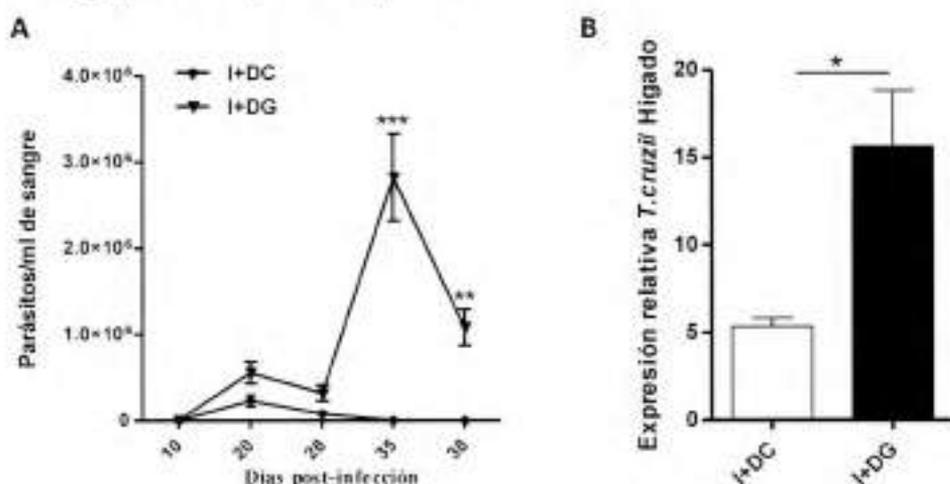
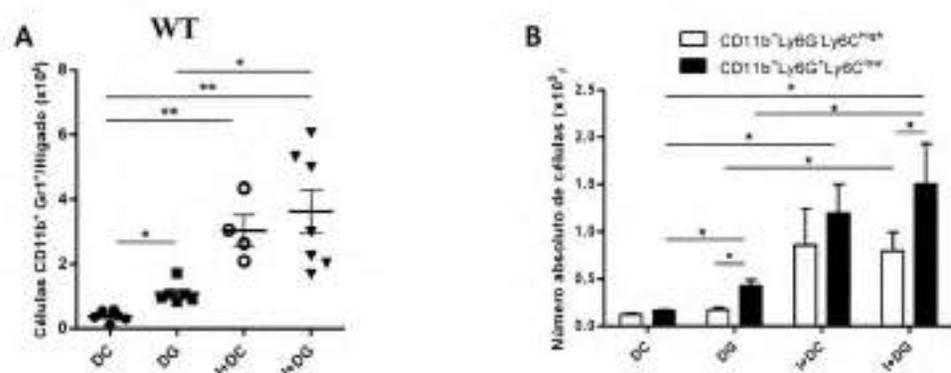


Figura 15. (A) La parasitemia fue monitoreada contando el número de tripomastigotes viables en sangre recolectada del seno retro-orbital luego de la lisis de glóbulos rojos con buffer cloruro de amonio % 0.87 en cámara de newbauer en animales WT del grupo I+DC e I+DG. Los datos fueron analizados empleando Two-Way anova test. **(B)** Evaluación cuantitativa de la carga parasitaria por q-PCR en el hígado de grupos infectados. La cuantificación de parásitos en 200 ng de ADN de tejido hepático se llevó a cabo mediante la amplificación de una secuencia de satélite del *T. cruzi*: TCZ a las 24 semanas de tratamiento. La carga relativa de parásitos / hígado se normalizó contra el control de endógeno eEF2. Dos muestras positivas, dos muestras negativas y una muestra sin ADN se incluyeron en cada q-PCR. Todos los datos se muestran como media \pm SEM de cuatro ratones por grupo de un experimento representativo de dos realizados. Una $p < 0.05$ fue considerado significativo utilizando T-test.

16. Estudio de células supresoras mieloides intra-hepáticas inducidas por la dieta y el efecto de la infección en esta población celular

Numerosas evidencias demuestran que esta población de células inmaduras denominadas CSMs se incrementan en la inflamación inducida por la obesidad como un mecanismo para contrarrestarla y mantener la homeostasis inmune y metabólica (146). También se han identificado en enfermedades infecciosas como la infección con *T. cruzi* [69, 70]. Teniendo en cuenta lo expresado con anterioridad, se decidió investigar el comportamiento de esta población celular en nuestro modelo, logrando demostrar un incremento significativo de células $CD11b^+Gr1^+$ en hígado de ratones infectados como así también en el grupo DG WT, a las 24 semanas (Fig. 16A). El análisis de las sub-poblaciones de CSMs reveló un aumento en el número absoluto a expensas de la sub-población Granulocítica (Gra) del grupo DG WT principalmente (Fig. 16B), mientras que en los grupos infectados la sub-población Gra también incrementó su número de manera significativa respecto a sus controles. En este sentido, nos propusimos analizar en hígado de animales TLR4^{-/-} como se encontraba esta población reguladora de la respuesta inmune en los grupos tratados (Fig. 16C) especialmente debido a que no encontrábamos desarrollo de EHNA en el grupo DG y a su vez, porque los grupos infectados exhibían una menor sobrevida comparado a los animales WT (Fig. 16D). Tal como pensábamos, dado a que no hay una alteración metabólica en hígado de animales del grupo DG TLR4^{-/-} no se observó un incremento en la población de CSMs. Si bien los grupos infectados presentaron un incremento de las mismas, éste fue debido a la población Mo y no a la Gra, lo cual podría estar influyendo en parte a la menor sobrevida presentada por la cepa TLR4^{-/-}. Por otro lado analizamos la capacidad supresora de la proliferación de linfocitos para asegurarnos de que esta población caracterizada sea la CSMs (Fig. 15E).



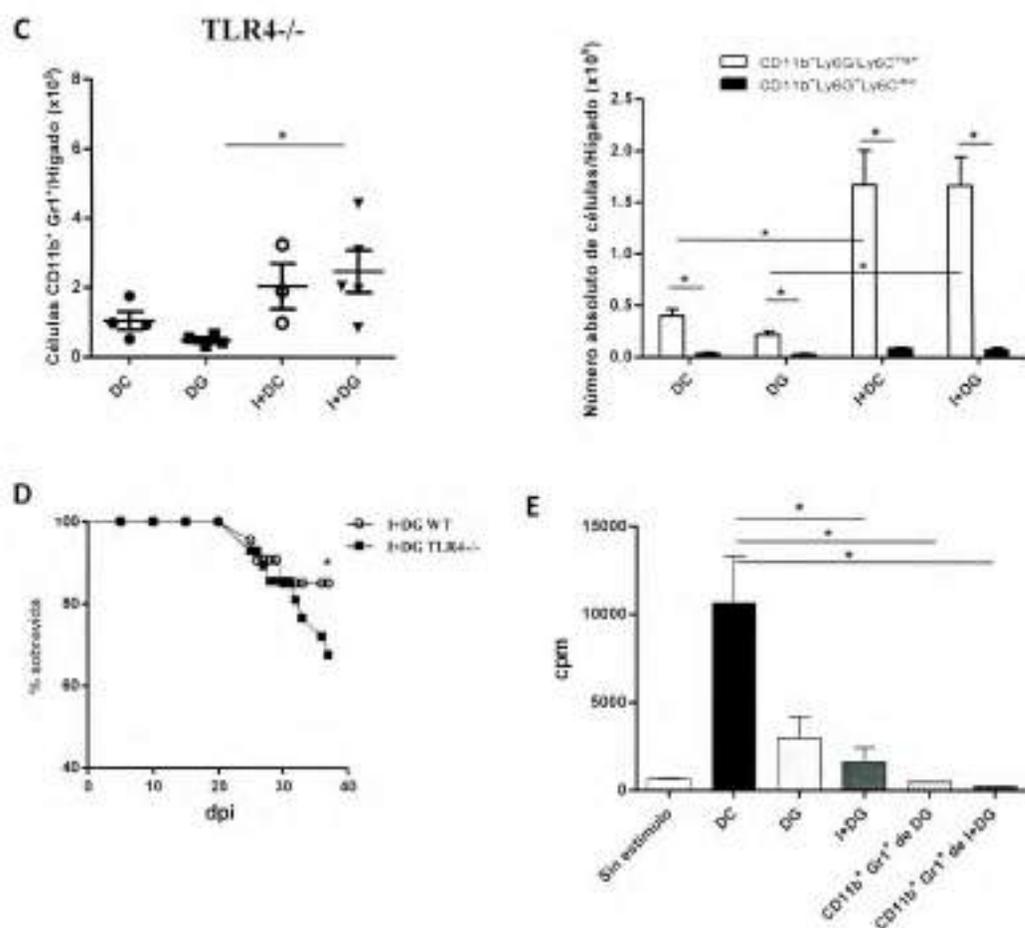


Figura 16. Análisis de las CSMs y sus sub-poblaciones en hígado de ratones WT y TLR4^{-/-}. LIHs fueron purificados de ambas cepas a las 24 semanas post-tratamiento con sus controles, se marcaron con anti-Ly6G-PE, anti-Ly6G-FITC, anti-CD11b-APC y anti-Gr1-PE, luego se analizaron mediante citometría de flujo. **(A)** Muestra el número absoluto de CSMs en hígado WT. **(B)** Se identificaron las sub-poblaciones de CSMs en hígado WT. La población Gra CSM se identificó como CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low} (Gra) (barras negras) y Mo CSM como CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{high} (Mo) (barras blancas). **(C)** Se observa en la cepa TLR4^{-/-} el número absoluto de CSMs y el de su sub-poblaciones en todos los grupos experimentales. **(D)** Se muestra el porcentaje de supervivencia comparando ambas cepas el grupo I+DG. **(E)** Para el ensayo de supresión de células CD11b⁺Gr1⁺ de ratones C57 WT tratados, se purificaron esplenocitos de animales alimentados con DG o con DG e infectados, las células se marcaron con anticuerpos anti-CD11b y anti-Gr1 para su aislamiento por sorter. Esplenocitos de animales DC fueron estimulados con Con A (5 µg/ml) por 72 h y cultivadas en presencia o ausencia de células CD11b⁺Gr1⁺ aisladas (relación 1:1) de animales DG o I+DG. Los valores de proliferación fueron medidos mediante la incorporación de ³H-timidina (c.p.m). La estadística significativa es determinada por One-Way ANOVA test.

CONCLUSIONES CAPÍTULO I

- La infección crónica con *T. cruzi* produce una reducción del peso corporal, mejora la sensibilidad a la insulina pero aumenta la concentración de triglicéridos y colesterol en plasma.
- En la esteatohepatitis inducida por la dieta (DG WT) a las 24 semanas se genera un aumento de LDL y VLDL mientras que en ratones TLR4^{-/-} el patrón de lipoproteínas no se ve alterado con la dieta grasa sugiriendo un papel central de TLR4 en la patogénesis de este desorden.
- La infección con *T. cruzi* reduce la esteatosis pero aumenta la inflamación hepática
- La DG y la infección con *T. cruzi* incrementan la expresión de la proteína ICAM-1 en tejido hepático y juntas poseen un efecto sinérgico.
- La infección con el parásito favorece el desarrollo de perfil inflamatorio de macrófagos M1 y la expresión del RS CD36 en macrófagos de hígado.
- La infección con *T. cruzi* exagera la respuesta local de células T inducida por la DG en animales WT.
- El reclutamiento de los linfocitos B, células NK y CDs en el hígado de la cepa WT es inducida por DG y se agrava por la infección parasitaria.
- La cascada de citoquinas inflamatorias a nivel sistémico es altamente dependiente de TLR4 e inducida por la DG y más aun, la infección parasitaria potencia la presencia de citoquinas plasmáticas en comparación a su control sin infectar.
- La infección con el parásito exagera la producción de ERO y peroxinitritos en leucocitos inflamatorios hepáticos del grupo DG.
- Las CSMs, principalmente la sub-población granulocítica, proveen un mecanismo natural para limitar la respuesta de células T provocada por el consumo de DG (hígado WT), la cual esta incrementada con la infección parasitaria (WT y TLR4^{-/-})
- La alimentación con una DG lleva a una mayor carga parasitaria en hígado.

DISCUSIÓN CAPÍTULO I

Se conoce ampliamente que la IR coexiste comúnmente con la obesidad, la hipertensión, la hiperglucemia y la dislipemia, la cual implica triglicéridos elevados, partículas de lipoproteínas de baja densidad pequeñas y densas, y la disminución de los niveles de colesterol HDL. Sin embargo, la relación entre la IR, la obesidad y los factores de la dieta son complejos y controvertidos. Los niveles elevados de insulina y glucosa en plasma debido a la IR son los principales componentes del síndrome metabólico [35]. Los resultados encontrados en este trabajo demuestran que una dieta media en grasas por sí sola induce un aumento de peso e IR. De este modo, se detectaron los valores más altos de HOMA-IR en el grupo DG a las 4 semanas y se mantuvieron elevados hasta las 24 semanas. Como resultado de la IR, generada en animales con DG, también se detectó un aumento de los triglicéridos, colesterol total y de LDL en plasma. Se demostró que la citoquina pro-inflamatoria TNF α puede estimular la secreción hepática de lípidos y aumentar los niveles de triglicéridos en plasma [36]. Además, TNF α posee alta actividad lipolítica en los adipocitos [37,38]. Curiosamente, el *T. cruzi* puede persistir en el tejido adiposo de seres humanos y ratones y convertirlo en un reservorio de la infección [39]. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran claramente que la infección con *T. cruzi* induce marcados cambios metabólicos, mejora la IR con reducción de HOMA-IR y disminuye el acumulo de triglicéridos hepáticos a las 24 semanas (infección crónica). En concordancia con estos resultados, recientemente el grupo de Tanowitz describió que la infección con el *T. cruzi* cepa Brasil indujo cambios en la homeostasis de la glucosa, inflamación de páncreas y parasitismo en células β pancreáticas [40], pero el efecto de la cepa Tulahuen en el páncreas no se conoce todavía. Otra explicación sería que el parásito podría requerir de lipoproteínas del huésped con el fin de multiplicarse en el interior de las células [41]. Además, enzimas del parásito que metabolizan los lípidos, podrían estar involucradas en la invasión, establecimiento y exacerbación de la infección [42]. Cabe destacar que el hígado es un depósito prominente de parásitos en la fase crónica, como vimos en la figura 15 por presentar carga parasitaria a las 24 semanas después de la infección, siendo clave el tipo de dieta suministrada. Varias observaciones sugieren que el *T. cruzi* toma ventaja del metabolismo de la célula huésped favoreciendo la oxidación de ácidos grasos sobre la oxidación de la glucosa [11]. Ensayos in vitro suplementando medio

de cultivo con ácidos grasos, presentaron una mayor tasa de proliferación del parásito en comparación con medio solo. Además, la evidencia muestra que la proteómica del *T. cruzi* regula positivamente la capacidad de absorción de ácidos grasos y la oxidación, lo que sugiere un acoplamiento del crecimiento del parásito con el metabolismo de ácidos grasos en el huésped [140]. En coincidencia con estos hallazgos, la infección con el parásito redujo el peso corporal (I+DG) de modo similar a resultados obtenidos por otros investigadores [31]. Además, se detectaron menores niveles de triglicéridos en sangre a las 4 semanas en el grupo infectado vs. DG. De manera sorprendente, la infección o DG o la combinación de ambas variables (I+DG) incrementaron la concentración de colesterol hepático y plasmático. Está demostrado que la infección por *T. cruzi* induce cambios en la homeostasis intracelular del colesterol, con depósito de LDL y colesterol total en los tejidos tanto durante la infección aguda y crónica [43]. También se ha demostrado que este parásito puede utilizar el receptor de LDL para invadir células [44].

Como era de esperar teniendo en cuenta la bibliografía reciente, el grupo DG TLR4^{-/-} no mostró cambios en el peso corporal y tampoco alteraciones metabólicas notables en comparación con el grupo DG WT vs su DC [26,45]. Cabe destacar que la infección aumentó los niveles de colesterol en plasma de animales DG TLR4^{-/-} a tiempos tardíos posiblemente por su participación en el metabolismo del colesterol.

Además, nuestros resultados son consistentes en demostrar que la combinación de *T. cruzi* con DG indujo mayor inflamación hepática en ratones WT que en los TLR4^{-/-}. Los niveles bajos de citoquinas sistémicas con reducción del número de LIHs en los grupos TLR4^{-/-} sustentan la afirmación previa. Por el contrario, las citoquinas pro-inflamatorias perturban la acción normal de la insulina en el tejido adiposo y muscular, lo cual podría ser un factor importante en la causa de la IR.

Altos niveles circulantes de citoquinas pro-inflamatorias en ratones DG WT así como en sujetos obesos [51], pueden contribuir a la IR y al bajo grado de inflamación sistémica. Por otra parte, las citoquinas TNF α , IL6 y IFN γ se ven aumentadas por la infección jugando un papel importante en el control de la replicación del parásito [52]. Estas citoquinas también se han asociado con la progresión del daño hepático [18] y cardíaco [53]. En los grupos TLR4^{-/-}, en el presente modelo de esteatohepatitis solamente la combinación de la

DG con la infección favoreció la producción de citoquinas inflamatorias. Mientras que, el papel de la IL6 en la esteatohepatitis es controvertido ya que se postula que es un factor clave en la progresión de esta enfermedad y el desarrollo de IR [54], otros investigadores asumen que la IL6 limitaría la endotoxemia y la obesidad asociada a IR [55]. Según los resultados de esta tesis, postulamos que niveles moderados de IL6 podrían limitar la progresión de la IR.

Los resultados hallados en el desarrollo de esta tesis demuestran un infiltrado de células F4/80⁺ M1 en el hígado del grupo DG sólo en los ratones WT sugiriendo que la polarización inflamatoria de macrófagos es dependiente de la señalización de TLR4 del mismo modo que en otros modelos de esteatosis [96]. De manera sorprendente, la infección parasitaria acentuó notablemente este fenotipo M1 en las dos cepas de ratón (WT y TLR4^{-/-}). Por lo tanto, la combinación de la infección más una dieta rica en grasas (I+DG) exacerbó el perfil M1 (F4/80⁺CD11c⁺TNF α ⁺) en ratones WT. El reclutamiento de estas células en la esteatohepatitis es coherente con los altos niveles de las quimiocinas CCL2 y CCL3 en hígado y en sangre, tal como se ha demostrado en este trabajo y en concordancia con otros investigadores [46,47]. Además, evidencias indican que TNF α , CCL2 y CCL3 también se producen durante el curso de la infección por *T. cruzi* [48,49], lo que podría explicar el efecto sinérgico de la infección en el marcado reclutamiento de células inflamatorias en el tejido hepático.

Por otra parte, resultados de esta tesis muestran que macrófagos hepáticos F4/80⁺ del grupo DG WT sobreexpresan el RS CD36, de manera más marcada en grupos infectados. Puesto que, miembros de la familia del RS CD36 han sido implicados como sensores de productos microbianos que median la fagocitosis y la inflamación; especulamos que PAMPs derivados del *T. cruzi* podrían interactuar directamente con este receptor y facilitar así la invasión y perpetuación de la infección. Este mecanismo podría explicar también la reducción del acumulo de grasa en el hígado en los grupos I+DG frente a DG WT. Además, los datos presentados aquí, muestran de manera inequívoca que LIHs entre ellos, linfocitos B, CDs, células NK y T citotóxicas activadas se incrementan durante la progresión de la esteatohepatitis en el grupo DG y más sugestivamente por la infección parasitaria.

Además, sólo con una DG que genera un sobrepeso, se encontró un aumento del número de células T CD4⁺ productoras IL17 en el grupo de DG WT, aunque otras fuentes productoras de IL17 como células NKT o T $\gamma\delta$ podrían estar involucradas. Resultados similares fueron obtenidos en humanos por otros investigadores en la obesidad. A su vez, la IL-17 y AGL sinergizan para producir IL-6 por los hepatocitos [56]. Al mismo tiempo, la señalización IL17 con su receptor IL17RA es clave en el control de la infección por *T. cruzi* [57]. Sin embargo, la señalización de IL-17 acelera la progresión de la esteatosis en ratones [58]. Por lo tanto, este estudio muestra por primera vez un papel sinérgico de IL-17 en la esteatohepatitis asociada con esta infección.

Por otro lado, los linfocitos T productores de IL-10, probablemente Th2 y/o células T reguladoras infiltrantes de hígado y la IL10 en plasma, sólo se detectaron en el grupo de DG WT. El papel protector de la IL-10 en IR puede estar involucrado en esta etapa de la esteatohepatitis, equilibrando el efecto de las citoquinas pro-inflamatorias. Por el contrario, en el grupo I+DG, no se detectó esta citoquina, lo que indica que la infección del parásito produce una marcada desregulación de este mecanismo anti-inflamatoria [50]. Además, los resultados de esta tesis muestran que las CSM, particularmente, la población granulocítica, estaría ejerciendo un papel regulador de la respuesta de linfocitos T contrarrestando la inflamación hepática.

Una intensa interconexión entre hepatocitos, leucocitos y citoquinas, sumado al estrés oxidativo y la apoptosis, son actores claves en la patogénesis de la esteatohepatitis [59]. En este escenario, los resultados obtenidos aquí demostraron un aumento de la producción de ERO por los macrófagos del hígado con proteínas nitradas y expresión de FasL en la superficie de células T, lo que puede llevar a la apoptosis y necrosis de los hepatocitos. Curiosamente, la infección del parásito agrava el estrés oxidativo en el presente modelo de esteatohepatitis.

La integración de los conocimientos sobre la etiopatogenia del desarrollo de la esteatohepatitis junto con la patogénesis provocada por la tripanosomiasis americana es de gran importancia para la salud humana. Nuestros resultados nos animan a plantear que, dado los cambios generados por el parásito en el contexto de una alimentación desbalanceada, éste protozoo puede ser un factor de riesgo para problemas hepáticos;

mientras que al mismo tiempo se da el escenario propicio para que el *T. cruzi* pueda multiplicarse siendo favorecido por lo niveles elevados de colesterol y triglicéridos en el huésped que, como ha sido reportado anteriormente, favorece su tasa de replicación.

Capítulo II

CAPÍTULO II

Efecto de la infección crónica con *Trypanosoma cruzi* en un modelo experimental de alteraciones metabólicas con impacto en la aterogénesis

INTRODUCCIÓN CAPÍTULO II

La Organización Mundial de la Salud postula que la aterosclerosis es el factor principal de enfermedades de la arteria coronaria y cerebrovasculares produciendo el 29% de las muertes en todo el mundo [141]. Inicialmente se sostenía que la aterosclerosis era exclusivamente impulsada por factores de riesgo como antecedentes familiares, diabetes, hipercolesterolemia, el tabaquismo y la hipertensión, pero evidencias recientes indican que la inflamación es un componente esencial de la patogénesis [142].

Inflamación aórtica

La aorta es la principal arteria del cuerpo humano, que en individuos adultos tiene 2,5 cm de diámetro y da origen a todas las arterias del sistema circulatorio excepto las pulmonares. Su función es transportar y distribuir sangre rica en oxígeno a todas esas arterias. Tradicionalmente los conceptos de la inflamación vascular se consideran como respuestas "de adentro-hacia afuera" basándose en las hipótesis de adhesión de monocitos-macrófagos al endotelio y la oxidación de los lípidos [143]. Estos mecanismos operan conjuntamente, sosteniendo el principio central de que la respuesta inflamatoria se inicia en la superficie luminal. Sin embargo, reportes recientes apoyan un nuevo paradigma, la hipótesis de "afuera hacia adentro", en donde la inflamación vascular se inicia en la capa adventicia y progresa hacia adentro, la íntima. Se ha demostrado en la capa adventicia, la presencia de infiltrados celulares con macrófagos, células espumosas (macrófagos cargados de lípidos), CPA, linfocitos B y T activados y fibroblastos asociados con neovascularización. Células residentes y migratorias depositan colágeno y componentes de la matriz extracelular y los leucocitos producen citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento a nivel local y regulan el estado redox que se propaga desde la adventicia hacia la íntima. En resumen, los mecanismos básicos incluidos la activación celular y la migración durante la respuesta inflamatoria vascular son altamente conservados en diferentes estados de enfermedad cardiovascular y los principales eventos inflamatorios comienzan en la adventicia [144, 145].

Actualmente no está clara la causa que desencadena la inflamación crónica en las placas ateroscleróticas. Se reportó que la hiperinsulinemia y la hiperglucemia con dislipemia aceleran la aterosclerosis inducida en ratones ApoE $-/-$ alimentados con una dieta estándar y que carecen del receptor de leptina [146]. Además de los factores establecidos, la inflamación y la infección han sido recientemente implicados como principales factores de riesgo de enfermedad aterosclerótica [147]. Un nuevo paradigma sugiere que la infección con bacterias y/o virus podría contribuir a la patogénesis de la aterosclerosis, ya sea en forma directa a través de la infección de células del tejido vascular o, indirectamente a través de los efectos sistémicos de las citoquinas, proteínas de fase aguda u otros factores solubles inducidos por la infección en sitios no-vasculares. Este paradigma se sostiene por múltiples estudios epidemiológicos que demuestran asociaciones entre el riesgo de morbilidad/mortalidad cardiovascular y marcadores de infección. Estudios experimentales también han demostrado una aceleración del desarrollo de la aterosclerosis en animales infectados e hiperlipémicos. Se han propuesto diferentes agentes infecciosos relacionados con mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, entre otros, *Chlamydia pneumoniae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori*, virus de la gripe, virus de la hepatitis C, citomegalovirus y el virus de la inmunodeficiencia humana [148]. Sin embargo, hay diferencias en los datos que avalan su asociación con la patogénesis de la enfermedad cardiovascular. En algunos casos, los agentes infecciosos se encuentran dentro de las placas y los organismos viables se han podido aislar lo que sugiere un efecto directo del microorganismo. En otros casos, la asociación se basa totalmente en biomarcadores.

De acuerdo con los estudios con *C. pneumoniae* y *P. gingivalis* se ha sugerido que aceleran el desarrollo de la lesión, al menos a través de un mecanismo mediado por TLR-2 [149] y aumentando la formación de células espumosas en los macrófagos infectados [150].

En humanos, la infección crónica por *T. cruzi* y su relación con la aterosclerosis ha sido sugerida por diferentes investigadores [151, 152] pero, hasta el momento, no se demostró ninguna vinculación. Berrisbetia y col. [153] evaluaron en pacientes en fase crónica asintomática y con cardiopatía de la enfermedad crónica de Chagas, los niveles triglicéridos, colesterol y lipoproteínas (HDL, LDL y VLDL), encontrando niveles significativamente mayores ($p < 0,05$) de colesterol, LDL y VLDL en pacientes con

cardiopatía comparados con los asintomáticos y los controles sanos. Estudios experimentales en este sentido son muy escasos. Se demostró que *T. cruzi* conjuntamente con una dieta rica en colesterol durante la fase aguda de la infección, produce un proceso aterogénico temprano en ratones CBA/J, cepa resistente a aterosclerosis [147]. Por otro lado, conejos infectados con *T. cruzi* de la cepa “Y”, a los cuales se les administró una dosis diaria de colesterol, mostraron una disminución en los niveles de colesterol total, colesterol HDL y LDL. Así mismo, el daño endotelial debido a la presencia de parásitos podría favorecer el depósito de colesterol en la microvasculatura y al mismo tiempo los bajos niveles de HDL, incrementaría la aterogenicidad de la dieta alta en colesterol [154].

OBJETIVOS CAPÍTULO II

GENERAL

Investigar la influencia de la infección con *T. cruzi*, en fase crónica de la enfermedad, como un factor pro-aterogénico en un modelo de alteraciones metabólicas inducidas por una DG, focalizando el estudio en la aorta de ratones C57 WT y TLR4^{-/-}.

ESPECÍFICOS

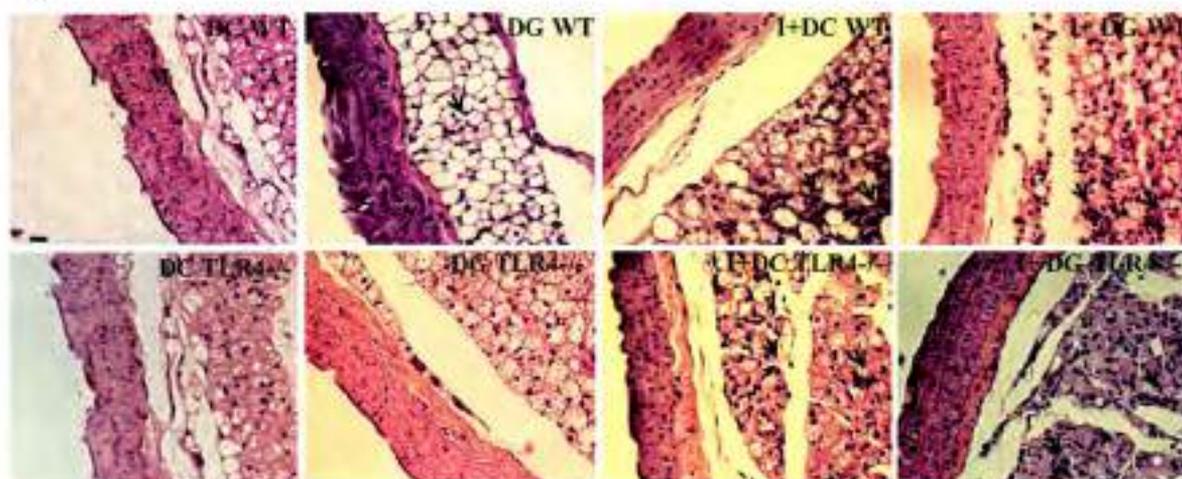
- Analizar comparativamente, en los 4 grupos de animales (DC, DG, I+DC, I+DG) de las dos cepas, la histopatología y la expresión de TLR2, TLR4 y CD36 de la arteria aorta.
- Estudiar el perfil de macrófagos M1 y M2 (con los marcadores: F4/80, CD206 y CD68), la expresión de Arginasa 1 y paralelamente las citoquinas y quimiocinas más relevantes en la aorta.
- Evaluar los tipos celulares que participan en las lesiones vasculares, analizando los marcadores de superficie celular, CD3, CD19, CD11c, F4/80 y NK1.1.
- Realizar experimentos *in vitro* con la línea celular de macrófagos murinos J774 para evaluar la formación de células espumosas inducidas por la infección con tripomastigotes- Tulahuen y la presencia de LDL nativa.
- Investigar si los efectos pro-aterogénicos del *T. cruzi* son directos y se encuentra carga parasitaria aórtica mediante q-PCR y ver si la misma es influenciada o no por el tipo de dieta.

RESULTADOS CAPÍTULO II

1. La infección con *T. cruzi* reduce la hipertrofia de adipocitos en la capa adventicia de la aorta generada por la dieta grasa a las 24 semanas pero incrementa su inflamación

Con los resultados obtenidos en el capítulo I y con el propósito de conocer los cambios en la arquitectura y morfología generados en la aorta durante el desarrollo de nuestro modelo, evaluamos cortes histológicos teñidos con H&E. En ratones DG WT la ingesta de DG durante 24 semanas, trajo aparejada la presencia de hipertrofia de adipocitos adventiciales y alteraciones del endotelio vascular de la aorta. Estos cambios morfológicos no se observaron en los ratones alimentados con DC WT. Es importante destacar que en los grupos infectados WT o en todos los grupos TLR4^{-/-}, no se observaron adipocitos hipertrofiados (Fig. 4A). De manera interesante, se detectó una elevada infiltración de leucocitos en la aorta del grupo DG WT y los grupos infectados testeados, WT o TLR4^{-/-}, confirmada por el recuento de leucocitos aislados y teñidos con Azul de tripan (Fig. 4B).

A



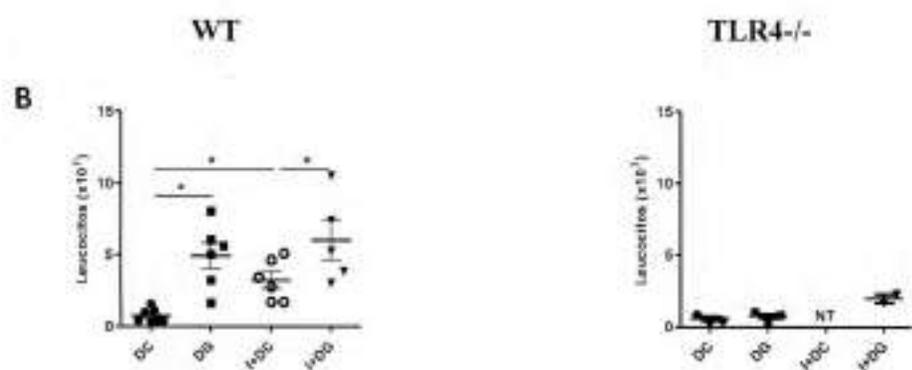


Figura 1. Cambios morfológicos en la aorta de animales WT o TLR4^{-/-} a 24 semanas. (A) Tejido aórtico de todos los grupos fueron coloreados con H&E (400x) Las flechas indican leucocitos infiltrantes. I: íntima, M: Media y A: Adventicia. Escala de barra: 20 μ m. (B) Se indica el número de leucocitos aislados de la aorta en los diferentes grupos de ratones de ambos genotipos. (* $p < 0,05$). Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes. (NT: no testeado)

2. La infección con *T. cruzi* aumenta el número de células F4/80⁺ en aorta en presencia de la dieta grasa

El siguiente estudio se realizó para investigar la presencia y el fenotipo de macrófagos en la aorta a las 24 semanas debido a que el macrófago es un tipo celular importante en el proceso de aterogénesis. Una vez que migran a la pared de la arteria, ellos propagan el desarrollo de la aterosclerosis mediante la modificación de las lipoproteínas, favorecen la acumulación de lípidos intracelulares, la remodelación del entorno extracelular, y promueven la coagulación local. Las evidencias indican la presencia de un gran número de citoquinas en combinación con la expresión de sus receptores en los macrófagos, señalando que estas células son importantes actores en el desarrollo de la lesión aterosclerótica. En el presente modelo de alteraciones metabólicas inducidas por la DG se observó un aumento significativo en los macrófagos aislados de la aorta en todos los grupos experimentales WT vs. DC WT. Los resultados analizando el número absoluto de células F4/80⁺ muestran un efecto sinérgico dado por la DG mas la infección parasitaria (Fig. 2A). A su vez, al evaluar el fenotipo de macrófagos M1 vs. M2 se observó una tendencia hacia un perfil M1 en todos los grupos siendo significativo solamente en los

grupos infectados (I+DC e I+DG) (Fig. 2B). El análisis del porcentaje de células F4/80⁺ purificadas de la aorta con IL10 intracelular positiva (fenotipo M2) mostró un aumento significativo solamente en el grupo DG (Fig. 2C). Notablemente, el porcentaje de macrófagos inflamatorios F4/80⁺CD11c⁺ (fenotipo M1) productores de la quimiocina CCL2 se incrementó en todos los grupos siendo el aumento más marcado en los grupos infectados (Fig. 2D).

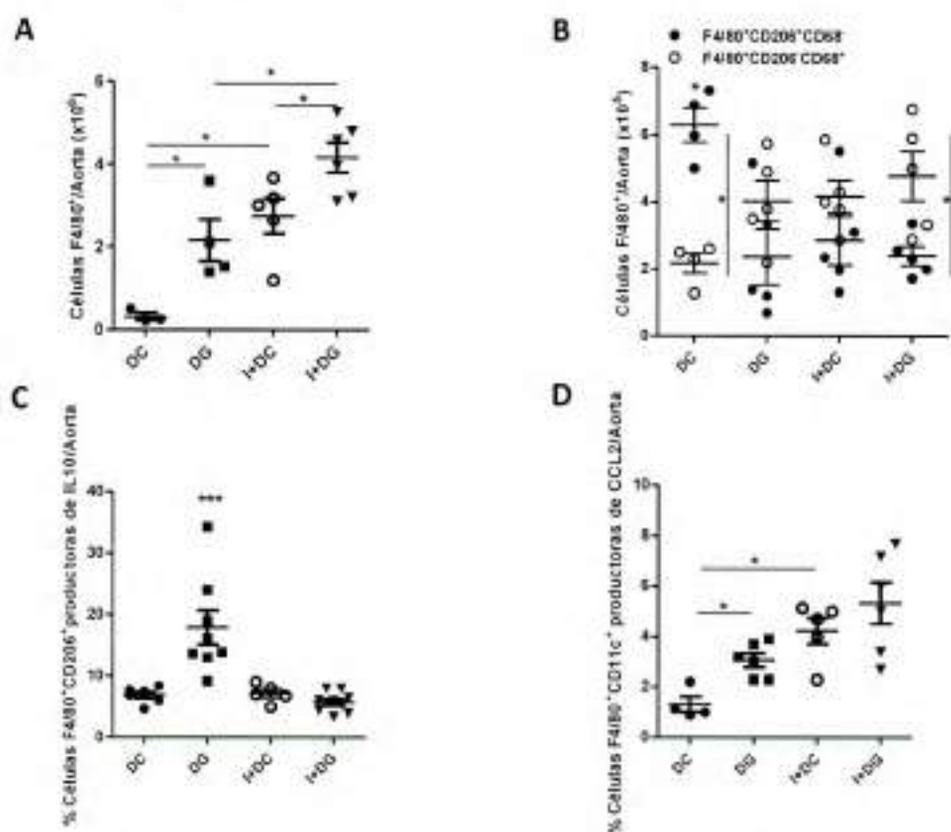


Figura 2: Expresión de marcadores M1/M2 en macrófagos aislados de aorta de los cuatro grupos de ratones B6 WT. Leucocitos de todos los grupos de ratones fueron purificados de aorta a las 24 semanas, se marcó con los anticuerpos anti-F4/80, anti-CD206, anti-CD68, anti-CD11c, anti-CCL2, anti-IL10. (A) Se muestra el número absoluto de leucocitos F4/80⁺ en los diferentes grupos. (B) Se indican el número absoluto de células F4/80⁺ de fenotipo M1 (CD206⁺CD68⁺) y M2 (CD206⁻CD68⁺) y (C) Porcentaje de células F4/80⁺ intra-aórticas productoras de IL10 y (D) CCL2. Estos ensayos se realizaron por citometría de flujo con tinción intracelular para las citoquinas y quimiocinas y se muestran como la media \pm SEM, n>4 ratones de un experimento representativo de dos realizados. Un valor de p <0,05 fue considerado significativo usando el test One-Way ANOVA.

3. Análisis de expresión de Arginasa-1 en aorta de animales WT y TLR4^{-/-} a 24 semanas post-tratamiento.

En base a los resultados previos de estas tesis, se investigó la expresión de Arg-1 en aorta de los diferentes grupos de animales. Cabe destacar que esta enzima fue hallada en macrófagos de lesiones ateroscleróticas tempranas en ratones ApoE^{-/-} [155-157] y también en placas ateroscleróticas de humanos [158]. Arg1 juega un papel crítico en muchas funciones inmunológicas en los macrófagos. Esta enzima compite con óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y cataliza la hidrólisis de L-arginina a L-ornitina y urea, un precursor de poliaminas y L-prolina. Por lo tanto, Arg1 puede suprimir la citotoxicidad mediada por ON a través de consumo de L-arginina, mejorar la síntesis de colágeno y la fibrosis a través de la formación de L-ornitina [159]. Arg1 también se ha demostrado que actúa como un supresor de la inflamación y la fibrosis dependiente de microorganismo, de allí se sabe que apoya el crecimiento de varios microorganismos incluyendo parásitos [160]. Los resultados de este trabajo muestran un aumento significativo en la expresión de Arg-1 en el grupo DG sólo en animales WT y en el grupo I+DC de ambas cepas, WT y TLR4^{-/-}. Llamativamente la DG sumada a la I (I+DG) condujo a una expresión significativamente menor de la enzima vs. el grupo I+DC tanto en animales WT como TLR4^{-/-} (Fig. 3).

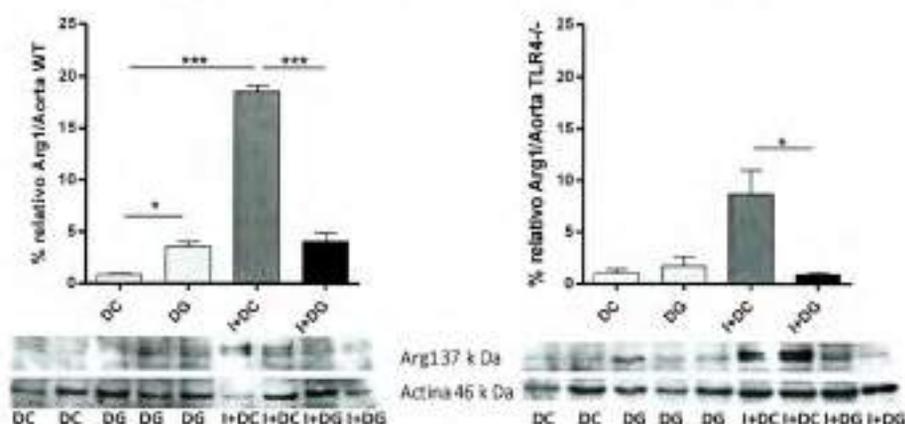
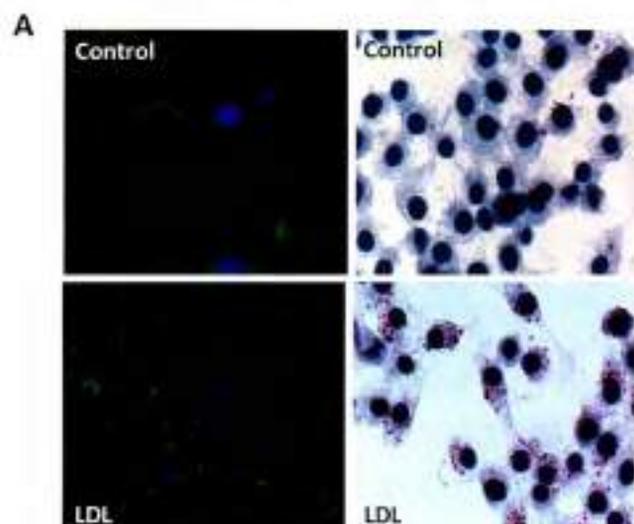


Figura 3: Expresión proteica del Arg-1 en aorta de ratones WT y TLR4^{-/-} a 24 semanas. (A) La expresión proteica de Arg-1 fue analizada por western blot en lisados de tejido aórtico de animales WT y TLR4^{-/-} en todos los grupos. La β -actina se utilizó como control de carga en el western blot. Los datos son representativos de dos experimentos cada uno realizado con tres ratones. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo usando el test One-Way ANOVA.

4. La infección con *T. cruzi*-Tulahuen induce la formación de *lipid droplets* en macrófagos y este proceso es incrementado con la administración de LDL *in vitro*

Con el objetivo de analizar si el *T. cruzi* es capaz de inducir células espumosas y de ser así, si existe algún sinergismo en la producción de estas células dado por la infección parasitaria más un exceso de lipoproteínas LDL, se realizaron ensayos utilizando macrófagos de la línea celular J774 infectados con tripomastigotes en relación 2:1 (Tc/macrófago) o se estimularon con LDL aisladas de plasma humano o bien fueron desafiados con ambos estímulos simultáneamente y posteriormente coloreados con *oil red O* (gotas rojas) y hematoxilina para teñir los núcleos o *Nile red* (gotas verdes) y Hoesch. Como era de esperar, la presencia de un exceso de LDL indujo la formación de *lipid droplets* en los macrófagos (Fig. 4A). La infección parasitaria también produjo la formación de células espumosas y la asociación de ambos estímulos mostró un fuerte incremento de estas células (Fig 4B-C). Debido a que el *T. cruzi per se* contiene moléculas agonistas para receptores TLR2 y 4, en paralelo se ensayó la capacidad de generar gotas lipídicas con ligandos de TLR2 y TLR4 (Pam3 y LPS respectivamente). Por otra parte y teniendo en cuenta que una de las citoquinas pro-inflamatorias producidas por los macrófagos como la IL6 es clave en la síntesis de proteínas de fase aguda, se realizó su determinación en el sobrenadante de cultivo obtenido en cada condición experimental. De manera interesante, los niveles de IL6 se correlacionaron con la cantidad de células espumosas coloreadas con *oil red O* (Fig. 4D).



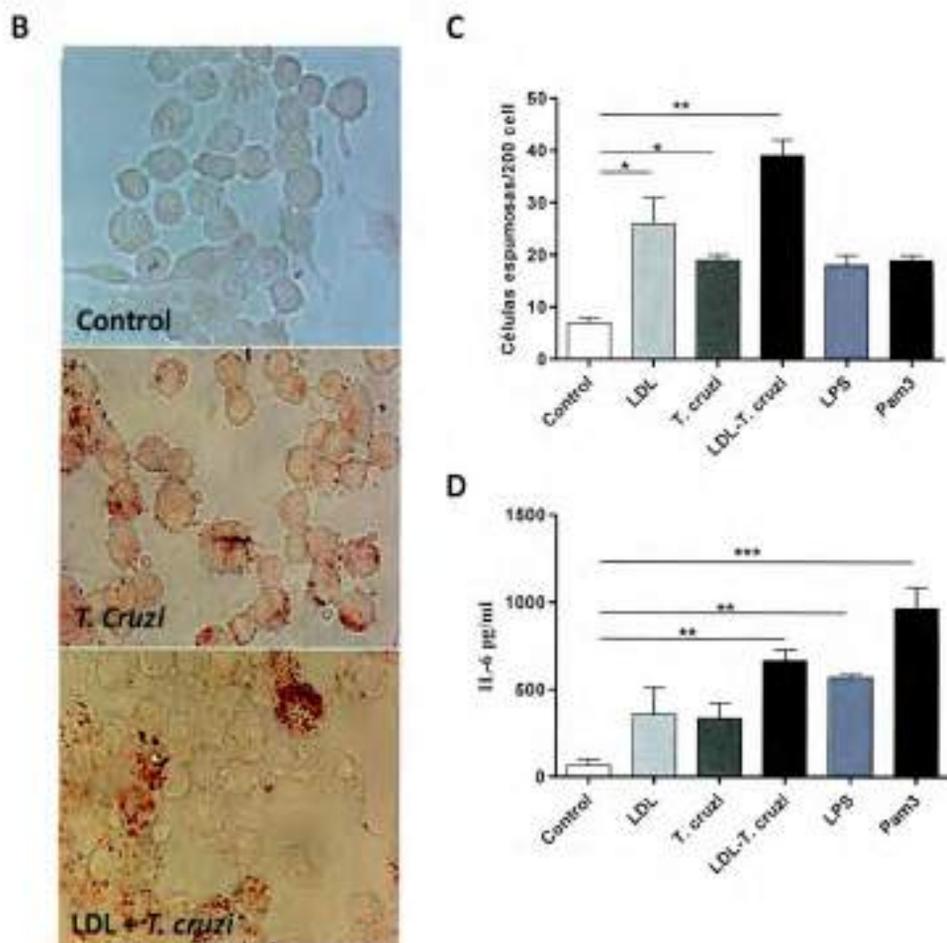
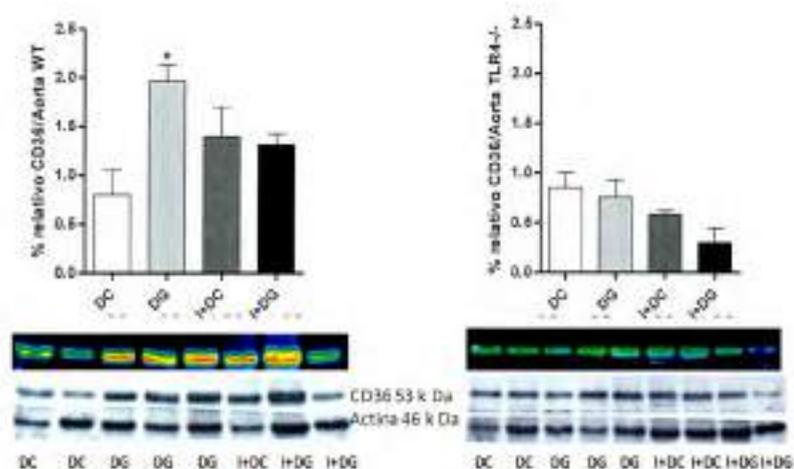


Figura 4: Formación de lipid droplets en macrófagos inducidos por LDL y la infección con *T. cruzi*. (A-C) Macrófagos J774 se cultivaron con DMEM mas 10% de SBF, se infectaron con *T. cruzi* (relación 2:1) o incubaron con LDL (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o ambos por 24 hs en presencia de cubreobjeto en el fondo de la placa. Luego se los fijó y tiñó con Oil red O o Nile red y se analizó el número de células espumosas (más de 10 gotas lipídicas por célula) observados por microscopia (óptica o de fluorescencia, respectivamente). (D) Niveles de IL6 en los sobrenadantes de cultivo de los distintos tratamientos por ELISA. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo usando el test One - Way ANOVA.

5. Incremento de la expresión del RS CD36 en el tejido aórtico de animales alimentados con DG WT

Para corroborar que el RS CD36 podría ser uno de los factores que median el acumulo de lípidos en células del tejido aórtico, analizamos su expresión en lisado de aorta por W. blot a 24 semanas de tratamiento. Se identificó una alta expresión de este RS solamente en el grupo DG WT (Fig. 5A). Además, se observó un mayor porcentaje de células F4/80⁺ CD36⁺ en células aisladas de la aorta del grupo DG y el grupo I+DG mediante citometría de flujo (Fig. 5B).

A



B

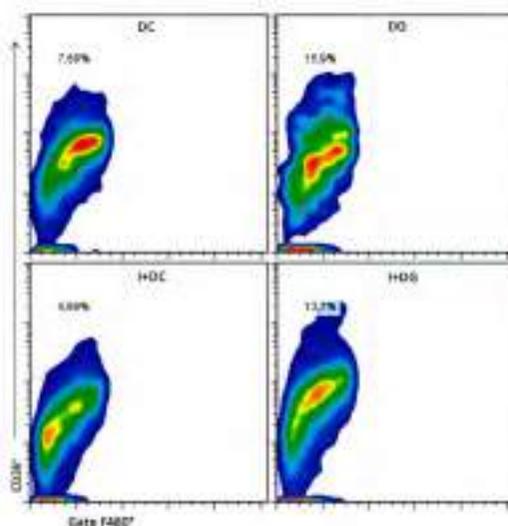
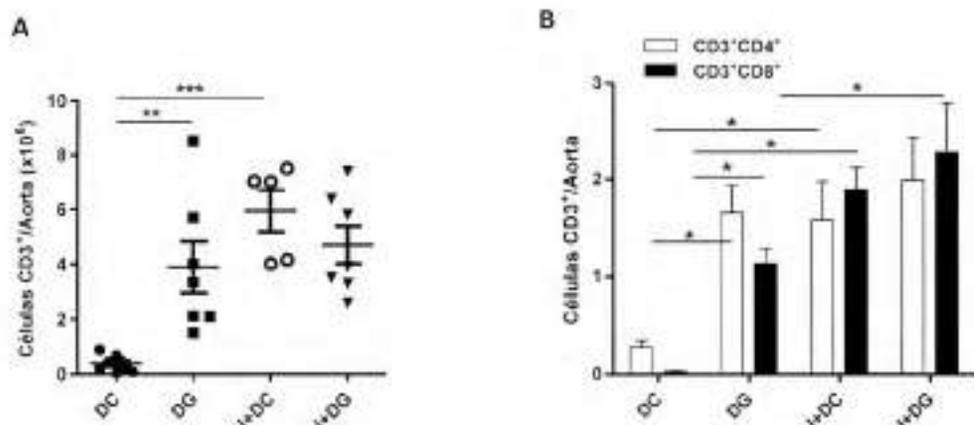


Figura 5: Expresión proteica del RS CD36 en aorta de ratones WT a 24 semanas (A) Se analizó la expresión de la molécula CD36 por western blot en lisados de tejido aórtico de animales WT y TLR4^{-/-}. La β -actina fue utilizada como control de carga en el western blot. **(B)** Se analizó el porcentaje células F4/80⁺ aisladas de aorta de animales WT de todos los grupos por citometría de flujo. Los datos son representativos de dos experimentos, cada uno realizado con tres ratones. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo usando el test One-Way ANOVA.

6. La dieta grasa favorece el infiltrado de linfocitos T en la aorta y esto se magnifica por la infección parasitaria

Dada la gran participación que tienen los linfocitos T en la generación y evolución de procesos vasculares, siendo la mayoría de las células T patogénicas en la aterosclerosis de perfil Th1 productoras de altos niveles de $\text{IFN}\gamma$ [161], se analizó en primer lugar el número total de células CD3^+ y las sub-poblaciones $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ en aorta de ratones WT a las 24 semanas por citometría de flujo. Se observó un elevado número de células T en todos los grupos experimentales respecto al grupo DC (Fig. 6A). Los resultados muestran un aumento tanto de células CD8^+ como CD4^+ en el grupo DG y más prominentemente en I+DG (Fig. 6B). De modo similar al hígado, se observó en células aisladas de aorta del grupo DG un alto número de células CD4^+ productoras de IL10 (fenotipo Th2) (Fig. 6C). Por otra parte, se encontró un elevado número de células T CD8^+ productoras de $\text{IFN}\gamma$ o $\text{TNF}\alpha$ en todos los grupos experimentales vs. DC WT, siendo más marcado en el grupo I+DG (Fig. 6D). Estos resultados se corroboraron por inmunofluorescencia (Fig. 6E) que mostraron la presencia de estas células $\text{CD8}^+ \text{IFN}\gamma^+$ en la adventicia en el grupo DG e I+DG. Nuestros datos indican que en este modelo de esteatohepatitis, el principal compartimento de células T de la pared arterial es la lámina adventicia en lugar de la capa íntima.



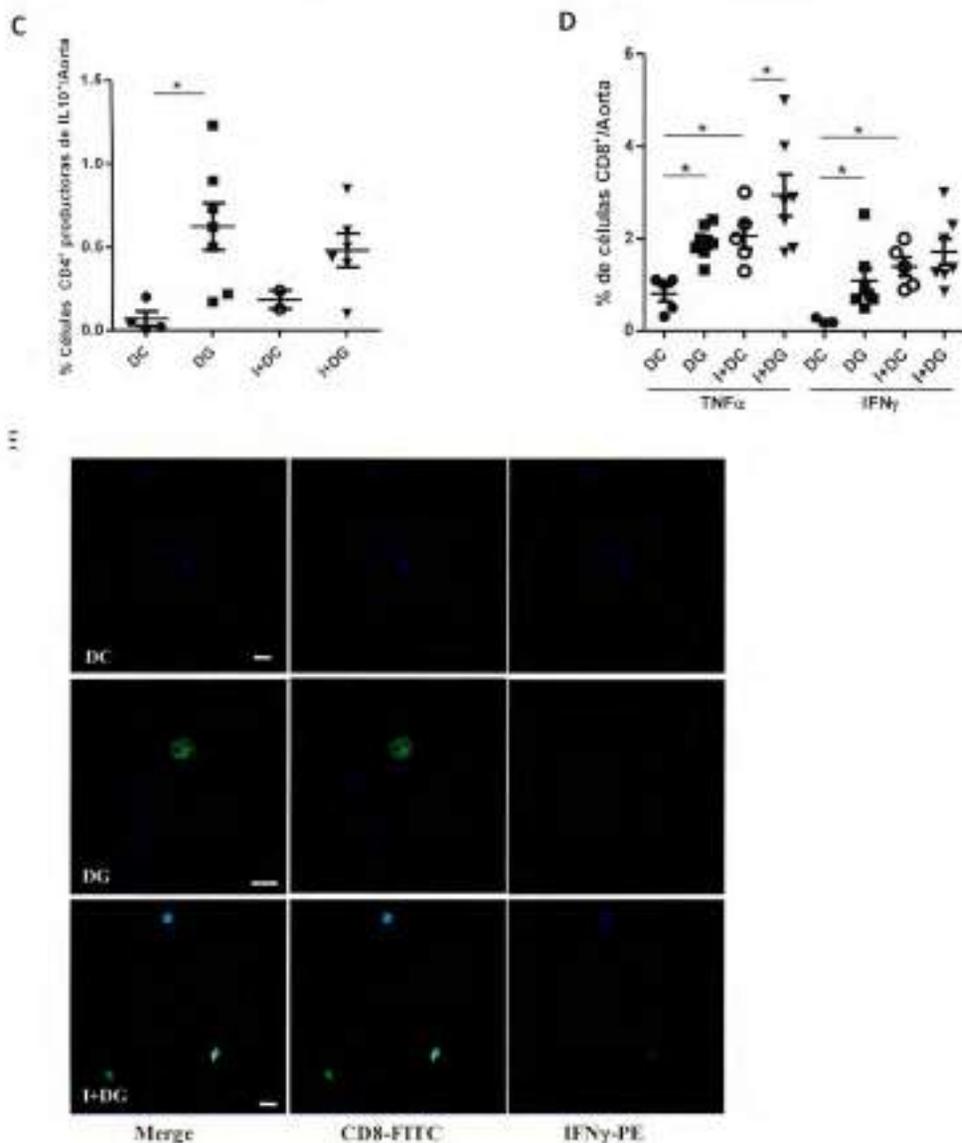


Figura 6: Análisis de linfocitos T en aorta de animales WT a 24 semanas. Leucocitos purificados de aorta de los diferentes grupos de ratones fueron obtenidos a las 24 semanas y se marcaron con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-TNF α , anti-IFN γ , anti-IL10. **(A)** Se observa el número absoluto de LT CD3⁺ y **(B)** el número absoluto de CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺. **(C)** Gráfico estadístico del porcentaje de células T CD4⁺ productoras de IL10 por tinción intracelular y **(D)** Porcentaje de T CD8⁺ infiltrantes de aorta productoras de TNF α e IFN γ . **(E)** Cortes histológicos longitudinales de aorta de los distintos grupos experimentales fueron desparafinados, bloqueados, permeabilizados y marcados con los anticuerpos anti-CD8 FITC (verde), anti-IFN γ PE (rojo) y el colorante Hoesch para identificar los núcleos por microscopia confocal. Barra de escala: 10 μ m y las flechas indican LT-CD8⁺ productores de IFN γ en adventicia. Los datos

se muestran como media \pm SEM de más de 5 ratones por grupo de un experimento representativo de tres realizados.

7. La dieta grasa induce el reclutamiento de linfocitos B, células dendríticas y NK en aorta lo cual es potenciado por la infección parasitaria

Los ensayos realizados mostraron un mayor número de células $CD11c^{high}$, $NK1.1^+$ (NK), y $NK1.1^+CD3^+$ (NKT), en la aorta de los ratones DG WT (Fig. 7A-B). El incremento en CDs y NK fue más notable en los ratones infectados WT. Por otro lado, los linfocitos B se incrementaron significativamente en los grupos infectados (Fig. 7C).

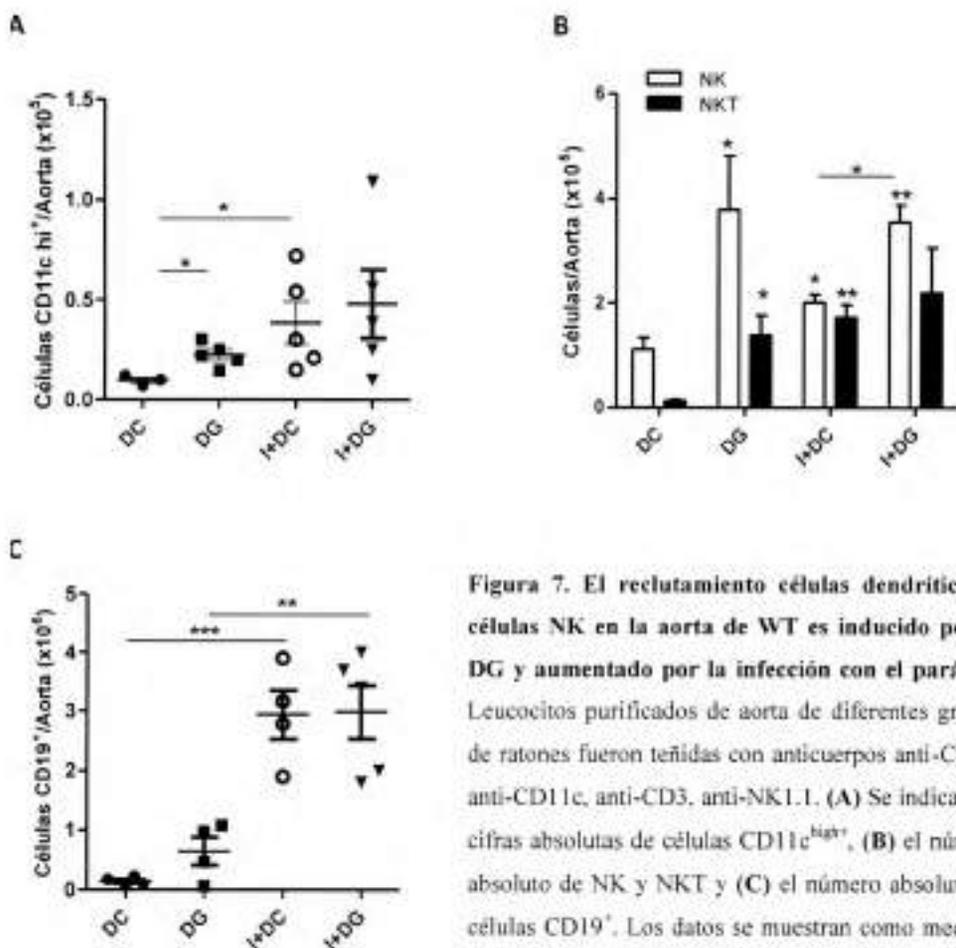
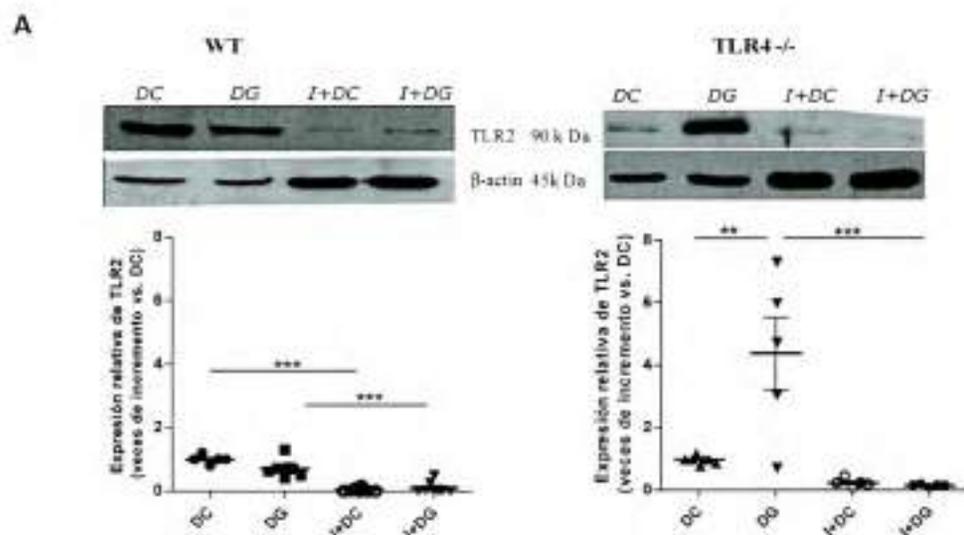


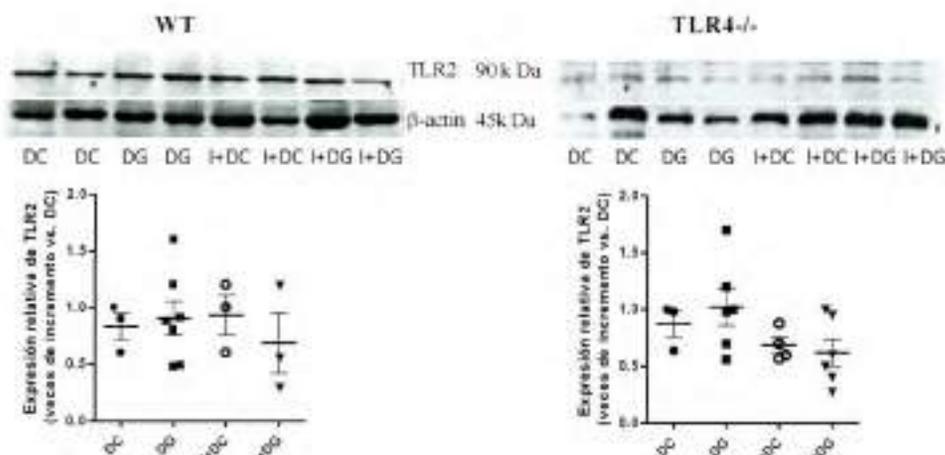
Figura 7. El reclutamiento células dendríticas y células NK en la aorta de WT es inducido por la DG y aumentado por la infección con el parásito. Leucocitos purificados de aorta de diferentes grupos de ratones fueron teñidas con anticuerpos anti-CD19, anti-CD11c, anti-CD3, anti-NK1.1. (A) Se indican las cifras absolutas de células $CD11c^{high}$, (B) el número absoluto de NK y NKT y (C) el número absoluto de células $CD19^+$. Los datos se muestran como media \pm SEM de 4 ratones por grupo de un experimento representativo de tres realizados.

8. En la etapa temprana del trastorno metabólico la dieta grasa aumenta la expresión de TLR4 en la aorta y la deficiencia de TLR4 favorece el aumento de TLR2 en ese tejido

En los últimos años estudios experimentales sobre el papel de estos receptores en ratones con hipercolesterolemia pusieron énfasis en modelos murinos manipulados genéticamente, propensos a la aterosclerosis. En ratones C57BL/6 doble knockout, apo E^{-/-} y TLR4^{-/-} o apo E^{-/-} y MyD88^{-/-}, Michelsen y col. (10), reportaron una reducción del tamaño y composición de lípidos en la placa de ateroma de sus aortas respecto a los wild type ya los apo E^{-/-} y TLR4^{+/+}, sugiriendo el compromiso de este receptor en el desarrollo de la placa. Teniendo en cuenta dichos trabajos, y los hallazgos de nuestro grupo que vinculan los Toll y la infección con *T. cruzi*, nos propusimos evaluar en nuestro modelo la expresión de los TLR2 y TLR4 en aorta. El estudio de la expresión de TLR2 y TLR4 en tejido aórtico a las 4 semanas reveló una mayor expresión de TLR2 en aorta de animales DG TLR4^{-/-} vs. DC e I+DG ($p < 0.01$, $p < 0.001$) y una expresión casi nula de TLR2 en los grupos infectados tanto TLR4^{-/-} como WT vs. DC (Fig. 8A). A 24 semanas (Fig. 8B) no hubo diferencias significativas en la expresión de la proteína TLR2 entre los grupos experimentales WT ni TLR4^{-/-}. Por otra parte los niveles proteicos de TLR4 a las 4 semanas fueron mayores en aorta de animales DG vs DC WT (Fig. 8C). La expresión de TLR4 disminuyó significativamente en los grupos infectados a las 12 semanas y a 24 semanas su nivel de expresión fue similar en los diferentes grupos.



B



C

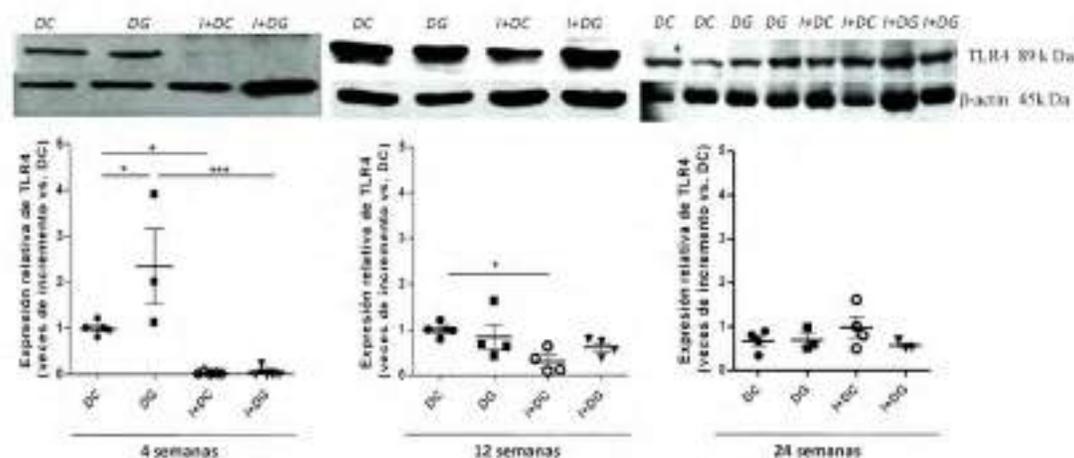


Figura 8: Cinética de expresión proteica de los TLR2 y TLR4 en aorta de ratones WT y TLR4^{-/-} a 4 y 24 semanas. Los receptores TLR2 y 4 fueron analizados por western blot en lisados de tejido aórtico de las cepas WT y TLR4^{-/-}. (A) Expresión de TLR2 en aorta a 4 semanas (B) 24 semanas. (C) Expresión de TLR4 en aorta a 4, 12 y 24 semanas. La β-actina fue utilizada como control de carga en el western blot. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos cada uno realizado con más de tres ratones. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo usando el test One-Way ANOVA.

9. La dieta media en grasas conduce a una mayor carga de parasitaria en aorta

Dada la fuerte respuesta inflamatoria a nivel local y sistémica que encontramos en el grupo I+DG, se investigó en primer lugar si se hallaban rastros del parásito en la aorta en nuestro modelo y luego si la dieta media en grasa influenciaba de alguna manera la carga parasitaria en dicho tejido. Para cumplir tales objetivos, se realizó un q-PCR, logrando observar un aumento significativo en la carga de ADN de *T. cruzi* en la aorta de los animales I+DG vs. I+DC (Fig. 9). Estas observaciones revelaron que la dieta es un factor clave en la carga parasitaria y en la inflamación vascular.

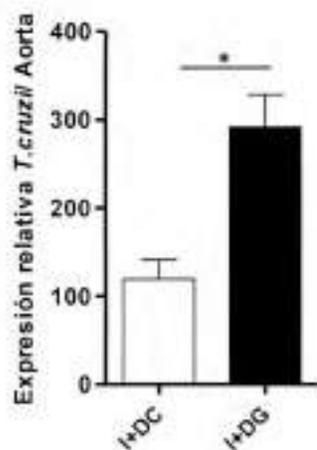


Figura 9. Evaluación cuantitativa de la carga parasitaria por q-PCR en aorta de grupos infectados. La cuantificación de parásitos en 200 ng de ADN de tejido aórtico se llevó a cabo mediante la amplificación de una secuencia de satélite del *T. cruzi*: TCZ a las 24 semanas de tratamiento. La carga relativa de parásitos / hígado se normalizó contra el control de endógeno eEF2. Dos muestras positivas, dos muestras negativas y una muestra sin ADN se incluyeron en cada q-PCR. Todos los datos se muestran como media ± SEM de cuatro ratones por grupo de un experimento representativo de dos realizados. Una $p < 0,05$ fue considerado significativo utilizando T-test.

CONCLUSIONES CAPÍTULO II

- La infección crónica con *T. cruzi* redujo la hipertrofia de adipocitos en la adventicia generada por la DG pero incrementó el infiltrado de células inflamatorias en la aorta.
- La infección con *T. cruzi* aumentó la presencia de células F4/80⁺ en aorta de ratones alimentados con DG y desvió el fenotipo de macrófagos M2 a M1, acentuando su estado pro-inflamatorio (productores de CCL2).
- La expresión de Arg-1 en aorta del grupo DG aumentó significativamente sólo en animales WT y en I+DC de ambas cepas, WT y TLR4^{-/-}. Llamativamente los grupos I+DG se relacionaron con un fenotipo más inflamatorio, ya que la suma de ambos estímulos redujo significativamente la expresión de Arg-1 en aorta en comparación al grupo I+DC .
- El receptor CD36 se incrementó en el tejido aórtico de animales alimentados con DG a las 24 semanas asociado con un mayor número de células F4/80⁺CD36⁺ en los grupos DG e I+DG WT.
- Se produjo un mayor reclutamiento local de linfocitos T en aorta por la dieta exacerbado por la infección con altos porcentajes de células citotóxicas productoras de IFN γ y TNF α . A su vez, células con fenotipo Th2 productoras de IL10 solamente se detectaron en el grupo DG WT.
- La DG indujo el reclutamiento de linfocitos B, NK y CDs en aorta de ratones WT lo que fue agravado por la infección parasitaria.
- Los resultados mostrados sugieren que la deficiencia de TLR4, el cual censa además de ligandos endógenos, ligandos del parásito, produjo de manera compensatoria un aumento de la expresión de TLR2 en tejido aórtico a tiempos tempranos.
- Se reporta por primer vez la presencia de ADN parasitario, lo cual permite suponer que habría un efecto directo del parásito, además de los indirectos ya reportados, en tejido vascular aórtico en este modelo. Más aún la alimentación con una DG lleva a una mayor carga parasitaria en dicho tejido.

DISCUSIÓN CAPÍTULO II

Es conocido que la inflamación asociada a la obesidad y trastornos en el metabolismo de lípidos puede promover el desarrollo de la aterosclerosis. En esta segunda parte de la tesis se demostró que la alimentación con una dieta sólo media en grasas, que lleva a un sobrepeso sin llegar a obesidad, produce cambios marcados en la integridad del tejido aórtico y llamativamente cuando es combinada con la infección parasitaria se potencia el infiltrado celular y la producción de citoquinas y quimiocinas inflamatorias a nivel local y sistémico.

Los estudios histológicos revelaron un aumento de gotas lipídicas e hipertrofia de los adipocitos en la adventicia de la aorta en los animales con DG a las 24 semanas. Este resultado no se observó en aorta de animales I+DG. Sin embargo, la infección incrementó la inflamación con un mayor reclutamiento de células inflamatorias a nivel local y en bazo. Aunque no se detectaron parásitos en la arteria por técnicas como la inmunofluorescencia, se logró demostrar la presencia de ADN parasitario en la aorta a través de q-PCR, técnica con alta sensibilidad, lo que indicaría que la inflamación se indujo por efectos directos, además de los indirectos hallados a nivel sistémico, como las proteínas de fase aguda, citoquinas, etc demostrados en este trabajo de tesis doctoral. De manera interesante, este hallazgo aporta por primera vez evidencia a favor de un efecto directo del *T. cruzi* sobre las lesiones tempranas de la arteria torácico-abdominal, lo que no había sido demostrado en otras situaciones experimentales empleando la cepa de ratón CBA/J e inóculo diferente [147]. En este sentido, se propone que una dieta media grasa junto con la infección e inflamación sistémica como se demostró en el capítulo anterior, podrían tener un fuerte efecto pro-aterogénico, alterando la integridad de la pared arterial y aumentando los niveles sistémicos de triglicéridos y colesterol en el grupo I+DG. Como se esperaba, los niveles de colesterol fueron mayores en el grupo de animales DG y aún más en el I+DG en comparación con el grupo control DC e infectados I+DC (resultados del capítulo I). Apoyan esta hipótesis, los datos obtenidos en ratones propensos al lupus alimentados con una dieta alta en colesterol al desarrollar lesiones ateroscleróticas, un hallazgo que admite la posibilidad de que la inflamación en combinación con una dieta grasa puede predisponer a la aterosclerosis [162].

Se ha demostrado ampliamente que la relación entre macrófagos M1/M2 de la inmunidad innata está ligada a la inmunidad adaptativa y es un sistema que trata de equilibrar la respuesta inmune. La IR se asocia a ambos fenotipos de macrófagos M1 y M2, del mismo modo que en la esteatohepatitis, en la inflamación aórtica a las 24 semanas en el grupo DG se detectaron ambos fenotipos de macrófagos en células aisladas del tejido aórtico. De este modo, macrófagos M1 $CD11c^+$ / $CD206^-$ conjuntamente con macrófagos M2 $CD206^+$ / $IL10^+$ se separaron por citometría de flujo. La producción de IL-10 inducida por la dieta estaría involucrada en el reclutamiento de macrófagos M2. Además, la Arg-1 enzima que se activa en macrófagos M2, se ha asociado con mejoras vasculares y proliferación de células musculares [155-157]. En este trabajo de tesis se demostró que la expresión de Arg-1 en aorta aumentó significativamente en animales DG WT y en infectados con DC de ambas cepas, WT y TLR4 $^{-/-}$. La infección con *T. cruzi* produjo un desvío en el fenotipo de macrófagos de M2 a M1 productores de CCL2 acentuando de este modo un estado pro-inflamatorio.

Además, la elevada expresión de CD36 uno de los receptores innatos más importantes en la internalización de lipoproteínas como las LDL modificadas, se incrementó en el tejido aórtico del grupo DG a las 24 semanas. Las plaquetas, ciertos endotelios y adipocitos además de monocitos/macrófagos diferenciados expresan este receptor [163, 164]. Este resultado se asoció con un mayor número de células $F4/80^+CD36^+$ provenientes de los grupos DG y también en ratones I+DG WT.

Por otra parte, estudios previos en ratones hiperlipémicos apoyan un papel pro-aterogénico de células Th1 y Th17 en la iniciación y progresión de la aterosclerosis y un efecto anti-aterogénico de las células Th2 [165-167]. Estudios en cepas de diferente base genética indican la existencia de una predisposición para desarrollar un fenotipo de Th en particular [168, 169]. En este estudio, el análisis del infiltrado de macrófagos y linfocitos T reveló un predominio del fenotipo inflamatorio Th1 en el grupo DG, efectos que fueron potenciados por la infección crónica con incremento de células $CD8^+$, NK^+ y NKT^+ en aorta, como ha sido reportado en otros modelos experimentales de aterosclerosis [170, 171]. Los resultados obtenidos también revelan el fenotipo Th2 con producción de IL10 intracelular solamente en el grupo DG. En este sentido, hay evidencia que sostiene que la

IL10 endógena protege contra la aterosclerosis en varios modelos experimentales [172, 173]. De manera interesante, al igual de lo que sucede en este modelo en hígado, la infección disminuyó los niveles de macrófagos y células TH2 productoras de IL10 y favoreció notablemente el infiltrado de linfocitos T CD4 (Th1) y CD8, resultados que concordaron con otro laboratorio [174] en el cual se demostró la producción de IL-6 y TNF α , infiltrado celular en el endotelio y músculo liso de aortas de ratones infectados con *T. cruzi*-Tulahuen.

Estudios recientes han demostrado el papel importante de los receptores TLRs en la respuesta inflamatoria en diferentes tejidos y destacan la interacción de estos receptores con los nutrientes, la microbiota intestinal y el tejido adiposo entre otros durante el desarrollo de trastornos metabólicos y la obesidad [175]. En ratones ApoE $-/-$ se demostró que TLR4 y TLR2 contribuyen a la acumulación de células espumosas en la etapa temprana de la aterosclerosis [176]. La deficiencia de TLR4 y TLR2 y también de las moléculas adaptadoras MyD88 y TRIF han demostrado un papel protector de la inflamación vascular y progresión de la aterosclerosis en distintos modelos de ratón [175]. Los resultados obtenidos aquí demuestran que la dieta grasa no indujo alteraciones histológicas en la aorta en animales DG TLR4 $-/-$ aunque la presencia de infiltrado celular en aorta fue inducida por la infección parasitaria. Se ha demostrado que la ausencia de TLR2 y TLR4 condujo a una disminución del tamaño de la lesión relacionados a una disminución en los niveles de CCL2 sistémicos [177, 178]; una quimiocina fundamental para el reclutamiento de monocitos a las placas ateroscleróticas. Los resultados de esta tesis muestran que la deficiencia de TLR4, el cual sensa además de ligandos endógenos, ligandos del parásito, produce de manera compensatoria un aumento de la expresión de TLR2 en tejido aórtico. Además, resultados obtenidos *in vitro* demostraron que la infección con *T. cruzi* cepa Tulahuen, del mismo modo que ligandos de TLR2 y TLR4, indujo la formación de células espumosas en una línea de macrófagos, fenómeno que se incrementó con el agregado de LDL. Se ha postulado que ligandos de TLRs pueden alterar el flujo de colesterol contribuyendo de este modo a la formación de células espumosas [179].

En conclusión, los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* e *in vitro* demuestran que la dislipemia inducida por una dieta grasa sumado a la infección con *T. cruzi* en fase

crónica potencia la respuesta inflamatoria en la aorta, mediada principalmente por macrófagos M1, linfocitos Th1 e inflamación sistémica favoreciendo el proceso de aterogénesis y a su vez incrementando la carga parasitaria.

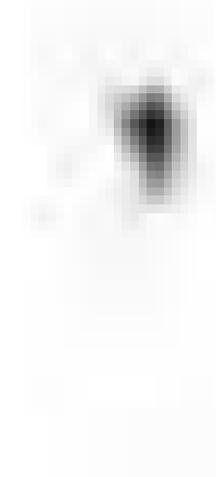
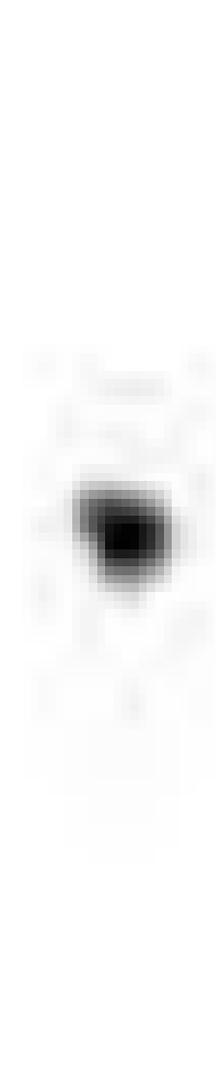
1870

1870



PUBLICACIONES

- "*Trypanosoma cruzi* infection is a potent risk factor for non-alcoholic steatohepatitis enhancing local and systemic inflammation associated with strong oxidative stress and metabolic disorders". Plos Neglected Tropical Disease. **Onofrio LI***, Arocena AR*, Paroli AF, Cabalén ME, Andrada MC, Cano RC, Gea S. En prensa.
- "Myeloid-derived suppressor cells are key players in the resolution of inflammation during a model of acute infection". European J. Immunol. 2014 Jan;44(1):184-94. doi: 10.1002/eji.201343606. Arocena RA*, **Onofrio LI***, Pellegrini VA, Carrera Silva EA, Paroli A, Cano CR, Aoki MP, Gea S. * Contribuyeron en igual medida en la producción del trabajo.



MATERIALES Y METODOS

Ratones, infección y parasitemia

Los ratones C57BL/6 (haplotipo MHC H-2Kb) fueron adquiridos de la Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina y los ratones C57BL/10ScNJdeficientes para TLR4 (Tlr4^{ps-del}) fueron obtenidos de Laboratorios Jackson, Bar Harbor, USA. Los animales se mantuvieron en el bioterio del CIBICI-CONICET (número de seguro de NIH-USA A5802-01) siguiendo las recomendaciones de la Guía de Uso y Cuidados de Animales de Experimentación (Consejo Canadiense de Cuidados de animales) y aprobado por CIBICI-CONICET. Grupos de animales (6 a 8 semanas) fueron divididos en 4 grupos experimentales: 1) animales alimentados con dieta estándar con bajo % en grasas: DC, dieta control (3% de grasas); 2) DG, dieta grasa (14% de grasas); o se los infectó intraperitonealmente con 100 tripomastigotes de la cepa Tulahuen alimentados con cada una de las dietas: 3) I+DC, infectado+dieta control y el grupo 4) I+DG, infectado+dieta grasa. La composición de la dieta control es: proteína: 26%, carbohidratos: 53%, lípidos: 3%, fibra cruda: 8% y minerales totales: 10%; la composición de la dieta grasa es: proteína: 25%, carbohidratos: 50%, lípidos: 14%, fibra cruda: 3% y minerales totales: 8%. Los ratones fueron pesados y anestesiados con isofluorano. La sangre fue obtenida por punción venosa en la cavidad retro-orbital. A las 24 semanas de tratamiento se los sacrificó y se les extrajo: hígado, bazo, aorta y sangre para posteriores análisis. Ratones sin infectar y alimentados con la dieta estándar fueron usados como controles. La infección fue corroborada con la prueba de ELISA Chagas (Wiener). Títulos de anticuerpos IgG anti-T.cruzi mayores a 1/1024 fueron detectados a 24 semanas. Los parásitos fueron mantenidos por pasajes seriados de ratón a ratón. La parasitemia se midió en sangre extraída del ojo del ratón y diluida con buffer de lisis para eliminar los glóbulos rojos. La cuantificación de los parásitos se realizó en Cámara de Neubauer. La parasitemia se expresó en parásitos/ml.

Separación de las células del ratón

Células del bazo e hígado se obtuvieron y homogenizaron a través de un filtro para tejidos. Los *leucocitos intra hepáticos* (LIHs) se purificaron centrifugando a 600g durante 20 minutos en una bicapa de gradientes de Percoll (Sigma) de 35% y 70%. Los glóbulos rojos

de la suspensión celular de bazo y de hígado se liso con un buffer de lisis (Sigma). El número de células viables se determinó por la exclusión de Azul de Tripán usando la cámara de Neubauer.

Para *extraer los leucocitos de aorta*, primero se perfundió con heparina (20U/ml) en PBS por punción en el ventrículo izquierdo del corazón y cortando a nivel del riñón derecho del animal. Luego se recolecta la aorta torácica abdominal y se la micro-disecciona. Se procede a digestión enzimática (125U/ml de colagenasa XI (Sigma), 60 U/ml de hialuronidasa tipo 1s (Sigma), 60 U/ml de DNasa I (Sigma) y 450 U/ml de colagenasa tipo I (Sigma)) en PBS conteniendo 20 mM de HEPES a 37° C por 1 hr. Finalmente, la suspensión celular fue obtenida por homogeneización y paso a través de un filtro de 70 μ m. El número de células viables se determinó por la exclusión de Azul de Tripán usando la cámara de Neubauer.

Para la *purificación de CSM* se preparó una suspensión celular del bazo de ratones I+LFD e I+MFD, los eritrocitos se removieron usando buffer de lisis. CSM se aislaron por cell sorting usando FACS Aria, marcando la población de interés con anticuerpos anti-Gr1 conjugado con PE y anti-CD11b conjugado con APC (BD Pharmingen). En la separación se obtuvo una pureza aproximada del 98%.

Ensayo de linfoproliferación

Esplenocitos fueron cultivados en triplicado en placas de 96 pocillos de fondo plano con 200.000 células por pocillo en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 2 mM de glutamina (Gibco, Invitrogen), 50 mM 2-mercaptoetanol (Sigma), y 40 mg/ml de gentamicina conteniendo 10% de Suero Bovino Fetal (GBO), simultáneamente estimulando con Con A (5 μ g/ml). Luego de la incubación a 37 grados y 5% de CO₂ por 48 hs se adicionó timidinatrítada (1 μ Ci [3H]thymidine, Amersham, Little Chalfont, UK) en cada pocillo. Los cultivos se cosecharon 18 hs después y se midió la incorporación de radioactividad usando un contador de centelleo.

Citometría de flujo

Un millón de esplenocitos o de leucocitos intra-hepáticos o de aorta se incubaron por 30 minutos a 4°C en medio de tinción (PBS con 1% de ASB y SBF) con los anticuerpos de interés y por último lavado con PBS. Para tinción de citoquinas intracelulares, las células se trataron con PMA (30 ng/ml; Sigma) más Ionomicina (500 ng/ml; Sigma) por 5 hs. A las últimas cuatro horas del cultivo se le agregó monensina (Golgi-Stop, BD Bioscience) o brefeldina (Golgi-Plug, BD Bioscience). Una vez cumplido el tiempo se realizó la tinción de moléculas de superficie, luego se fijaron y permeabilizaron con Cytotfix/Cytoperm buffer (BD Biosciences) y se lavó con una solución Perm/Wash 1X (BD Biosciences). Finalmente, se realizó la incubación con anticuerpos intracelulares. Las muestras se lavaron por última vez, se examinaron usando el citómetro de flujo BD FACS Canto II y se analizaron usando el programa Flowjo (TreeStar).

Para la determinación de la expresión de CD107a se cultivaron 500.000 LIH conjuntamente con PMA (30 ng/ml; Sigma), Ionomicina (500 ng/ml; Sigma) y el anticuerpo anti-CD107a-FITC (Clon 1D4B -BioLegend) en una placa de fondo en U. Las células se incubaron a 37°C en 5% CO₂ por una hora y se agregó monensina (Golgi-Stop, BD Biosciences) en una concentración de 6 ug/ml y se lo incubó por un tiempo adicional de 4 horas a 37 °C en 5% CO₂. La monensina previene la acidificación de las vesículas endocíticas, así se evita la degradación de la re internalización de CD107a de la superficie, permitiendo la visualización de este marcador luego de la estimulación. Por último, los LIHs cultivados se marcaron con anticuerpo anti-CD8 PE (eBioscience) por 30 minutos a 4°C.

Los anticuerpos utilizados fueron: anti-CD11b conjugado con APC o FITC (clon M1/70; BD Pharmingen), anti-Ly6G/Ly6C conjugado con PE o APC (Gr-1, clon RB6-8C5; BD Pharmingen), anti-Ly6G conjugado con PE o PECy7(clon 1A8-BD Pharmingen), anti-Ly6C FITC (clon AL-21; BD Pharmingen), anti-CD4 APC(clon GK1.5 BioLegend), anti-CD8 PE o FITC (clon 53-6.7 eBioscience) anti-IL6 PE (MP5-20F3, eBioscience), anti-IFN γ PE (XMG1.2, eBioscience), anti-IL-17A PE (clon eBio17B7; eBioscience), anti-CD11c APC (clon N418 BioLegend), anti-F480 PE, APCCy7 o PECy7(Clon BM8-eBioscience-BioLegend), anti CD3 PE o PERCP (Clon 145 2C11-BD Pharmigen), anti-

CD86 APCCy7 (Clon GL1 BioLegend), anti-CD19 PE (Clon 1D3-eBioscience), anti-Dx5(clone Dx5-eBioscience, anti-NK1.1 APC, anti-CD36 PE

Detección de ERO

El colorante sensible a la oxidación: H₂DCFDA (Molecular Probes/Invitrogen) se utilizó para medir la producción de ERO por parte de células F4/80⁺ y Gr1⁺. El reactivo H₂DCFDA tiene la propiedad de ingresar a las células en donde esterasas intracitoplasmáticas escinden los grupos acetatos generando un compuesto que en presencia de ERO se oxida, lo cual permite el monitoreo del incremento de fluorescencia por citometría de flujo. LIHs fueron incubados a 37°C en RPMI 1640 en presencia de 10 μ M de H₂DCFDA por 30 minutos. Para inducir la activación, las células fueron simultáneamente cultivadas, conjuntamente con H₂DCFDA más PMA 30 ng/ml (Sigma-Aldrich). Luego las células se marcaron con anticuerpos anti-F4/80 APCCy7 y anti-Gr1 PE. El análisis fue llevado a cabo por citometría de flujo.

Análisis de citoquinas

Se recolecto el plasma a las 24 semanas de tratamiento de ratones infectados tratados y sin tratar. Se realizó un ensayo de ELISA para las citoquinas IL6, IL12, IFN γ , IL17, IL10 y la quimiocina MCP1. Para ello las placas de ELISA se sensibilizaron con el anticuerpo de captura contra la citoquina de interés (PharMingen y e-Bioscience) durante la noche a 4° C. Luego, se lavaron las placas y se bloquearon con suero bovino fetal 10% por 2 hs a temperatura ambiente. Los sobrenadantes de los diferentes grupos se incubaron por toda la noche a 4° C. La placa se lavó nuevamente y se incubó con el anticuerpo anti-citoquina biotilnado (PharMingen y e-Bioscience) por una hora a temperatura ambiente. Las curvas de testigos se generaron usando citoquinas recombinantes para cada una de ellas (eBioscience, PharMingen). Luego de lavar, se agregó estreptavidina-peroxidasa y se incubo por 30 min. Finalmente las placas se lavaron y la reacción fue revelada usando tetrametil bencidina (TMB) y H₂O₂, y se leyó a 450 nm en un Microplatereader (Bio-Rad).

Western Blot

Preparación de proteínas de tejido en buffer RIPA: tejido hepático y aórtico se homogeneizaron y lisaron con buffer lisis (1% Triton X-100, 0.5% de sodio, 9% SDS, 5% dithiothreitol (DTT), 1mM ortovanadato de sodio, 10 g PMSF, 30 ug de aprotinin en PBS) por 30 minutos a 4° C. Luego se centrifugó el preparado a 13000 rpm por 10 min. El sobrenadante recuperado se fraccionó y conservo a -70° C. La concentración de proteínas se cuantificó por la técnica fluorométrica en Qubit (Invitrogen).

En primer lugar la electroforesis se realiza diluyendo 50 ug de proteínas en un buffer de carga (2-mercaptoetanol, azul de bromofenol y glicerol) y se calienta a 100° C por 5 minutos. Se siembra el preparado en geles de poliacrilamida al 10% conteniendo SDS y se realiza la corrida electroforética por 1 hr a 150 volt. Las proteínas separadas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) aplicando un campo eléctrico (100 volt) durante 70 minutos con refrigerante.

En segundo lugar las membranas conteniendo las proteínas transferidas se bloquean utilizando usando PBS Albumina al 2% durante 2 hs a temperatura ambiente. Luego del bloqueo, la membrana se incuba con el anticuerpo primario correspondiente, a 4° C durante toda la noche. En este trabajo de tesis se utilizó un anticuerpo policlonal anti-TLR2 producido en conejo (1/400), anti-TLR4 producido en conejo (1/200) y un anti-actina producido en cabra (1/400) para control de carga, dirigidos todos contra ratón. Los anticuerpos fueron adquiridos en Santa Cruz biotechnology. Las membranas se lavan exhaustivamente con PBS/Tween 20 al 0,5% con cambios frecuentes cada 6 minutos. Posterior al lavado, se incuba con el anticuerpo secundario anti-cabra (1/1000) y anti-conejo (1/3000) unido a peroxidasa (Sigma) durante 1 hr en agitación a temperatura ambiente. Se realiza nuevamente varios lavados exhaustivamente por 1 hr con PBS/Tween 20 al 0,5% con cambios frecuentes cada 6 minutos.

Por último se revela empleando un sistema quimioluminiscente ECL (Amersham Pharmacia Biotech) que contiene cumárico, el sustrato para la enzima, H₂O₂ y un componente luminiscente, luminol. Las membranas se exponen con una placa radiográfica

(Kodak) en oscuridad. La intensidad de las bandas fueron cuantificadas mediante el uso del software GelPro.

Estudios de microscopía

Los LIHs de todos los grupos tratados fueron cultivados con o sin Con A por 48 hs. Estas células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 10 minutos a temperatura ambiente, bloqueadas con PBS Albumina al 1% por 2 horas a temperatura ambiente y se marcaron con anticuerpos anti-CD3 conjugado con FITC, anti-F4/80 conjugado con FITC, anti-NT conjugado con Alexa Fluor 488, anti-p47^{phox} conjugado con PE y anti-FASL conjugado con PE. Se descarta el excedente de anticuerpo y se lava 3 veces con PBS-Tween al 0.05%. Luego se marcaron con el fluorocromo Hoechst 33258 (2 ug/ml) que se une a ADN y se lavó tres veces con PBS-Tween al 0.05%. Finalmente se realizó el montaje con una solución de Fluor-Save (Invitrogen) y se visualizó usando el microscopio confocal FV1000 (Olympus).

Por otro lado se realizaron cortes histológicos en parafina de hígado y aorta de los 8 grupos de animales. Primero se perfundió intra-cardíacamente con 10ml de una dilución de heparina en PBS. Se tomaron las muestras de tejido y se fijaron con 10% de PBS-formaldehído y se embebieron en parafina. Las secciones de tejido se cortaron a un espesor de 5 micras. Las secciones se desparafinaron por pasajes seriados en xilol y concentraciones decrecientes de etanol (100-70 %) y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E). La acumulación de triglicéridos (TG) en el hígado fue examinado por tinción Negro Sudán IV. Otros cortes de las mismas condiciones se marcaron con anticuerpos anti-CD8 FITC y anti-IFN γ PE. Los preparados se visualizaron con el microscopio NIKON ECLIPSE TE-2000 Uequipado con una cámara de vídeo digital.

Medición de TG en hígado

Un gramo de tejido hepático se homogeneizó con PBS usando un homogeneizador de mano. Los homogeneizados se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a 4 ° C. Se recogió el sobrenadante y se determinó los niveles de TG usando kits comerciales enzimáticos (Roche) en un autoanalizador Hitachi Modular P800.

Medición de los lípidos plasmáticos

Después de 4, 12 y 24 semanas de tratamiento, se tomaron muestras de sangre luego de 10 hs. de ayuno en los ratones. Concentraciones de colesterol plasmático total (CT) y TG fueron cuantificadas con el uso de kits enzimáticos (Roche) en un autoanalizador Hitachi P800 modular.

Determinación de la resistencia a la insulina

Se calculó mediante el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) utilizando la siguiente fórmula: glucemia en ayunas (mg / dl) \times insulina en ayunas (mU / ml) / 405. Los niveles de insulina en plasma se midieron con un kit de RIA insulina Escudo DPC A Count (Siemens) utilizando Ingetron MODELO MN2200-E. Los niveles de glucosa en plasma se midieron usando un kit enzimáticos (Roche) con Hitachi modular P800.

Estudio de la expresión génica mediante PCR cuantitativa (q-PCR)

Muestras de ADN se aislaron de 50 mg de tejido hepático de animales pertenecientes a los grupos I+DC e I+DG a 24 semanas de tratamiento utilizando un Kit AccuPrep Genomic DNA Extraction (BIONNER), de acuerdo al protocolo del fabricante. Las muestras fueron almacenadas a -80°C . La cantidad y pureza del ADN se determinó con el espectrofotómetro Lector de microplacas de Synergy HT Multi-Mode (Biotek), y sólo las muestras con alta pureza se utilizaron en los experimentos. 200 ng de ADN fueron amplificados por q-PCR utilizando SYBR Green PCR Master Mix Energy 2x (Applied Biosystems, Life Technologies) y cebadores específicos para una secuencia satélite del *T. cruzi*, denominada TCZ. Como control endógeno, se usaron cebadores del factor de elongación 2, eEF2 [36]. Cada par de *primers* fue probado para alcanzar las condiciones apropiadas de amplificación. La secuencia de primers utilizados fueron: Tcz1 (S: 5'-CGA GCT CTT GCC CAC ACG GGT GCT-3' y Tcz2 (AS: 5'-CCT CCA AGC AGC GGA GAT TTC AGG-3') [180]; y eEF2 (S: 5'-AAG CTG ATC GAG AAG CTG GA-3' y AS: 5'-CCC CTC GTA TAG CAG CTC AC-3'). Brevemente, se amplificó la secuencia Tcz de 195pb utilizando un paso de desnaturalización de 95°C durante 10 min seguida de una repetición de 40 ciclos de PCR con una temperatura de desnaturalización de 95°C durante 15 s, una temperatura de hibridación y extensión de 60°C durante 1 min, y una curva de disociación, mediante el uso

del termociclador 7500 Tiempo real PCR System (Applied Biosystems). El patrón interno eEF2 (186pb) se amplificó con el mismo perfil térmico. Todas las extracciones de ADN y las reacciones de amplificación se realizaron con los apropiados controles negativos para detectar la contaminación en cualquier etapa del procedimiento y con controles positivos que dieron resultados reproducibles durante todos los experimentos. Cada muestra se ensayó por triplicado. Para determinar los niveles de expresión génica TCZ se utilizó el método comparativo Ct, conocido como Método 2- $\Delta\Delta$ CT [181].

Purificación de LDL plasmática humana para experimentos *in vitro*

A) Extracción de muestra

- 1- Ayuno 12 Hs del donante
- 2- Extraer 10 ml de sangre entera con heparina
- 3- Centrifugar a 2.500 rpm 5'
- 4- Agregar 78,54 ul de EDTA Wiener por ml de suero.

B) Procedimiento

- 1- Para un volumen final de 600ul: **VLDL**
 - Cargar 360ul de KBr densidad 1,006g/ml en un tubo A y sembrar 240 ul de suero en el fondo del tubo.
 - Centrifugar en microcentrifuga 2hs, 100.000 rpm a 15°C.
 - Reservo 240 del sobrenadante como VLDL.
 - Recuperamos 300 ul del infranadante sin tocar el fondo y lo pasamos a un tubo B
- 2- Separación **IDL**
 - Al tubo B agregar 12,5 ul de KBr densidad 1,34 g/ml. Se mezcla.
 - Sobre esta mezcla se agregan muy despacio 225 ul de KBr densidad 1,019 g/ml. No mezclar.
 - Centrifugar 2hs, 100.000 rpm a 15°C.
 - Reservo 240 ul del sobrenadante como IDL
 - Recuperamos 300 ul del infranadante sin tocar el fondo y lo pasamos a un tubo C.

3- Separación LDL

-Al tubo C le agregamos muy despacio 57,6 ul de KBr densidad 1,34 g/ml más 182,4 KBr densidad 1,063 g/ml. Se mezcla.

-Centrifugo 2.30hs a 100.000rpm a 15°C.

-Reservo 240 ul del sobrenadante como LDL.

-Recuperamos 300 ul del infranadante sin tocar el fondo y lo pasamos a un tubo D en el caso de querer aislar HDL.

C) Dializar

- 1) Dejar *Over Night* dializando en PBS a 4°C en agitación y luego pasar por columnas PD10

D) Concentrar: mediante el uso de columnas Centricon (Amicon)

-Medir proteínas concentradas y guardar a -20°C o -70°C si se va a usar mucho tiempo después.

F) Corrida de Apo B en poliacrilamida para analizar pureza

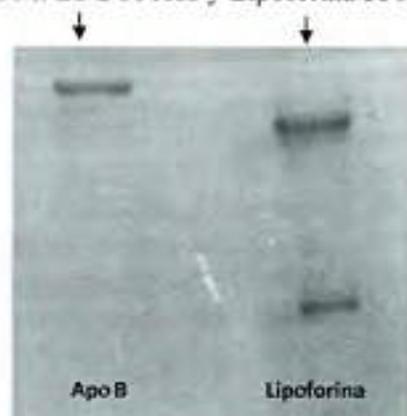
- Gel separador: 4,5%

Bis Acrilamida: 1,5 ml Tris-HCl 8,8: 2,5 ml Agua: 6ml Persulfato de Amonio: 50ul Temed : 10ul (Siempre 1º)
--

- Gel de arriba: 1,5%

Bis Acrilamida: 480 ul Tris-HCl 6,8: 1 ml Agua: 2,3 ml Persulfato de Amonio: 50ul Temed : 10ul (Siempre 1º)

- Correr aproximadamente 35' hasta que el frente de corrida se vaya a 150 V
- Muestras: LDL: (10ug muestra + 5 ul sample buffer + 10 PBS) y Lipoforina (2,8 ug/ul): (3,5 ul muestra + 10 ul SB + 10 PBS).
- Teñir con Azul Brillante de Comassie toda la noche en estufa 37°C.
- Lavar y fijar con Ácido acético 10ml, Metanol 40 ml y H2O 50 ml.
- PM: LDL 550Kd y Lipoforina 350KD aprox.



Mantenimiento de la línea celular de macrófagos murinos J774A.1 en cultivo

Se cultivaron en cápsulas de petri en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con gentamicina, glutamina al 10% SBF. Se dejaron crecer hasta confluencia (aprox. 4 días) a 37°C y 5% CO₂. Luego, con tripsina-EDTA o PBS frío se despegaron para experimentos o propagación.

Análisis estadísticos

Para comparar diferentes condiciones experimentales, el análisis de varianza (Two-way (cuando las variables fueron los distintos tiempos y los tratamientos) o One-way ANOVA) se usó con la prueba post de Bonferroni utilizando el software GraphPad versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, USA). La prueba de Student de dos colas se empleó para la comparación entre el control y muestras experimentales. Diferencias con valores de $p < 0,05$ se consideraron significativas, siendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AGL	Ácidos grasos libres
Arg-1	Arginasa-1
AST	Aspartato aminotransferasa
ALT	Alanino aminotransferasa
CDs	Células dendríticas
CK	Célula de Kupffer
CPA	Células presentadoras de antígeno
Con A	Concavalina A
CSM	Células supresoras mieloides
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
ERO	Especies reactivas de oxígeno
<i>HFD</i>	<i>High fat diet</i>
HGNA	Hígado graso no alcohólico
ICAM-1(CD54)	Molécula de adhesión intracelular 1
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
IR	Insulino resistencia
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LIH	Leucocitos intra-hepáticos
MCPI (CCL2)	Proteína 1 quimioattractante de monocitos
MIP1 α (CCL3)	Proteína 1 α inflamatoria macrófago
NK	Natural Killer
NT	Nitración de la tirosina
ON	Óxido nítrico
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
RS	Receptor <i>scavenger</i>

SM	Síndrome metabólico
TA	Tejido adiposo
TG	Triglicéridos
Th	T helper
Treg	T regulatorias
TLR	Toll like receptor
WT	Wild type

BIBLIOGRAFIA

1. Tanowitz, H.B., et al., *Trypanosoma cruzi* infection in diabetic mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1988. **82**(1): p. 90-3.
2. Combs, T.P., et al., *The adipocyte as an important target cell for Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem*, 2005. **280**(25): p. 24085-94.
3. Nagajyothi, F., et al., *Chagas disease, adipose tissue and the metabolic syndrome*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009. **104 Suppl 1**: p. 219-25.
4. Tanowitz, H.B., et al., *Adipose tissue, diabetes and Chagas disease*. *Adv Parasitol*. **76**: p. 235-50.
5. Kosteli, A., et al., *Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue*. *J Clin Invest*. **120**(10): p. 3466-79.
6. Fritz, I.B., *Factors influencing the rates of long-chain fatty acid oxidation and synthesis in mammalian systems*. *Physiol Rev*, 1961. **41**: p. 52-129.
7. Brener, Z., *Biology of Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*, 1973. **27**: p. 347-82.
8. Ferreira, A.V., et al., *Evidence for Trypanosoma cruzi in adipose tissue in human chronic Chagas disease*. *Microbes Infect*, 2011. **13**(12-13): p. 1002-5.
9. Garg, N., et al., *Gene expression analysis in mitochondria from chagasic mice: alterations in specific metabolic pathways*. *Biochem J*, 2004. **381**(Pt 3): p. 743-52.
10. Sugden, M.C., K. Bulmer, and M.J. Holness, *Fuel-sensing mechanisms integrating lipid and carbohydrate utilization*. *Biochem Soc Trans*, 2001. **29**(Pt 2): p. 272-8.
11. Caradonna, K.L., et al., *Host metabolism regulates intracellular growth of Trypanosoma cruzi*. *Cell Host Microbe*, 2013. **13**(1): p. 108-17.
12. Poulos, A., *Very long chain fatty acids in higher animals--a review*. *Lipids*, 1995. **30**(1): p. 1-14.
13. Ghisla, S. and C. Thorpe, *Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview*. *Eur J Biochem*, 2004. **271**(3): p. 494-508.
14. **WHO, Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2010. **Fact sheet, no 340**.
15. Gascon, J., C. Bern, and M.J. Pinazo, *Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries*. *Acta Trop*, 2010. **115**(1-2): p. 22-7.
16. Schmunis, G.A. and Z.E. Yadon, *Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem*. *Acta Trop*, 2010. **115**(1-2): p. 14-21.

17. Dutra, W.O., et al., *Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104 Suppl 1**: p. 208-18.
18. Girones, N., H. Cuervo, and M. Fresno, *Trypanosoma cruzi-induced molecular mimicry and Chagas' disease*. Curr Top Microbiol Immunol, 2005. **296**: p. 89-123.
19. Tarleton, R., *Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease*. Int J Parasitol, 2001. **31**(5-6): p. 550-4.
20. Gea, S.G., N; Pellegrini, A; Carrera Silva, E; Cano R; Aoki, MP, *Cruzipain, a major Trypanosoma cruzi cystein protease in the host-parasite interplay*. Immunologia, 2007. **Article in press**.
21. Carrera-Silva, E.A., et al., *TLR2, TLR4 and TLR9 are differentially modulated in liver lethally injured from BALB/c and C57BL/6 mice during Trypanosoma cruzi acute infection*. Mol Immunol, 2008. **45**(13): p. 3580-8.
22. Cencig, S., et al., *Parasitic loads in tissues of mice infected with Trypanosoma cruzi and treated with AmBisome*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(6): p. e1216.
23. Marcon, G.E., et al., *Trypanosoma cruzi: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2011. **106**(1): p. 85-91.
24. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
25. Pellegrini, A., et al., *The role of Toll-like receptors and adaptive immunity in the development of protective or pathological immune response triggered by the Trypanosoma cruzi protozoan*. Future Microbiol, 2011. **6**(12): p. 1521-33.
26. Aoki, M.P., et al., *Nonimmune Cells Contribute to Crosstalk between Immune Cells and Inflammatory Mediators in the Innate Response to Trypanosoma cruzi Infection*. J Parasitol Res, 2012. **2012**: p. 737324.
27. Maganto-Garcia, E., et al., *Rab5 activation by Toll-like receptor 2 is required for Trypanosoma cruzi internalization and replication in macrophages*. Traffic, 2008. **9**(8): p. 1299-315.
28. Campos, M.A.S., et al., *Activation of Toll-Like Receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from a Protozoan Parasite*. J. Immunol., 2001. **167**(1): p. 416-423.

29. Oliveira, A.C., et al., *Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to Trypanosoma cruzi glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with T. cruzi*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5688-96.
30. Gazzinelli, R.T. and E.Y. Denkers, *Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(12): p. 895-906.
31. Tarleton, R.L., *Immune system recognition of Trypanosoma cruzi*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(4): p. 430-4.
32. Graefe, S.E., et al., *Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to Trypanosoma cruzi in mice*. Microbes Infect, 2003. **5**(10): p. 833-9.
33. Torrico, F., et al., *Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute Trypanosoma cruzi infection in mice*. J Immunol, 1991. **146**(10): p. 3626-32.
34. Holscher, C., et al., *Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of Trypanosoma cruzi-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase*. Infect Immun, 1998. **66**(3): p. 1208-15.
35. Cummings, K.L. and R.L. Tarleton, *Inducible Nitric Oxide Synthase Is Not Essential for Control of Trypanosoma cruzi Infection in Mice*. Infect. Immun., 2004. **72**(7): p. 4081-4089.
36. Knubel, C.P., et al., *3-Hydroxy kynurenine treatment controls T. cruzi replication and the inflammatory pathology preventing the clinical symptoms of chronic Chagas disease*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26550.
37. Ouaissi, A., et al., *The Trypanosoma cruzi Tc52-Released Protein Induces Human Dendritic Cell Maturation, Signals Via Toll-Like Receptor 2, and Confers Protection Against Lethal Infection*. J. Immunol., 2002. **168**(12): p. 6366-6374.
38. Coelho, P.S., et al., *Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from Trypanosoma cruzi trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(5): p. 837-44.
39. Ponce, N.E., et al., *Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease, modulates interleukin-6-induced STAT3 phosphorylation via gp130 cleavage in different host cells*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(3): p. 485-94.
40. Shoda, L.K., et al., *DNA from protozoan parasites Babesia bovis, Trypanosoma cruzi, and T. brucei is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage*



- expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide.* Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2162-71.
41. Bafica, A., et al., *Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection.* J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3515-9.
42. Caetano, B.C., et al., *Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with Trypanosoma cruzi.* J Immunol, 2011. **187**(4): p. 1903-11.
43. Gravina, H.D., et al., *Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with Trypanosoma cruzi.* PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63100.
44. Carrera-Silva, E.A., et al., *Importance of TLR2 on hepatic immune and non-immune cells to attenuate the strong inflammatory liver response during Trypanosoma cruzi acute infection.* PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(11): p. e863.
45. Silva, G.K., et al., *Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against Trypanosoma cruzi infection.* J Immunol, 2010. **184**(3): p. 1148-52.
46. Silva, G.K., et al., *Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1beta response and host resistance to Trypanosoma cruzi infection.* J Immunol, 2013. **191**(6): p. 3373-83.
47. Goncalves, V.M., et al., *NLRP3 controls Trypanosoma cruzi infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production.* PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(10): p. e2469.
48. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.* Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
49. Rodrigues, M.M., A.C. Oliveira, and M. Bellio, *The Immune Response to Trypanosoma cruzi: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development.* J Parasitol Res, 2012. **2012**: p. 507874.
50. Oliveira, A.C., et al., *Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against Trypanosoma cruzi in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice.* PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000870.

51. Acosta Rodriguez, E.V., et al., *Trypanosoma cruzi* infection beats the B-cell compartment favouring parasite establishment: can we strike first? *Scand J Immunol*, 2007. **66**(2-3): p. 137-42.
52. Lenzi, H.L., et al., *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. *Exp Parasitol*, 1996. **84**(1): p. 16-27.
53. Martin, D. and R. Tarleton, *Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection*. *Immunol Rev*, 2004. **201**: p. 304-17.
54. Garg, N., M.P. Nunes, and R.L. Tarleton, *Delivery by Trypanosoma cruzi of proteins into the MHC class I antigen processing and presentation pathway*. *J Immunol*, 1997. **158**(7): p. 3293-302.
55. Silverio, J.C., et al., *CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental Trypanosoma cruzi-elicited cardiomyopathy*. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(4): p. e1002645.
56. Padilla, A.M., J.M. Bustamante, and R.L. Tarleton, *CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection*. *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(4): p. 385-90.
57. Tarleton, R.L., *Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 1990. **144**(2): p. 717-24.
58. Kumar, S. and R.L. Tarleton, *The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol*, 1998. **20**(5): p. 207-16.
59. Barrias, E.S., T.M. de Carvalho, and W. De Souza, *Trypanosoma cruzi: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 186.
60. Silva, J.S., et al., *Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental Trypanosoma cruzi infection*. *J Exp Med*, 1992. **175**(1): p. 169-74.
61. Bahia-Oliveira, L.M., et al., *IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology?* *Braz J Med Biol Res*, 1998. **31**(1): p. 127-31.
62. Morgan, J., et al., *Anti-Trypanosoma cruzi antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease*. *Am J Trop Med Hyg*, 1996. **55**(4): p. 355-9.

63. Cerban, F.M., et al., *Chagas' disease: IgG isotypes against Trypanosoma cruzi cytosol acidic antigens in patients with different degrees of heart damage*. Clin Immunol Immunopathol, 1993. **67**(1): p. 25-30.
64. Machado, F.S., et al., *Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease*. Semin Immunopathol, 2012. **34**(6): p. 753-70.
65. Barbosa de Oliveira, L.C., et al., *Antigen-specific IL-4- and IL-10-secreting CD4+ lymphocytes increase in vivo susceptibility to Trypanosoma cruzi infection*. Cell Immunol, 1996. **170**(1): p. 41-53.
66. de Araujo, F.F., et al., *Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(5): p. e992.
67. Tosello Boari, J., et al., *IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during Trypanosoma cruzi infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils*. PLoS Pathog, 2012. **8**(4): p. e1002658.
68. Goni, O., P. Alcaide, and M. Fresno, *Immunosuppression during acute Trypanosoma cruzi infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+)immature myeloid suppressor cells*. Int Immunol, 2002. **14**(10): p. 1125-34.
69. Cuervo, H., et al., *Myeloid-derived suppressor cells infiltrate the heart in acute Trypanosoma cruzi infection*. J Immunol, 2011. **187**(5): p. 2656-65.
70. Arocena, A.R., et al., *Myeloid-derived suppressor cells are key players in the resolution of inflammation during a model of acute infection*. Eur J Immunol, 2014. **44**(1): p. 184-94.
71. Ludwig, J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease*. Mayo Clin Proc, 1980. **55**(7): p. 434-8.
72. Asrih, M. and F.R. Jornayvaz, *Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance*. J Endocrinol, 2013. **218**(3): p. R25-36.
73. Tsochatzis, E.A., et al., *Insulin resistance and metabolic syndrome in chronic liver diseases: old entities with new implications*. Scand J Gastroenterol, 2009. **44**(1): p. 6-14.
74. Swinburn, B.A., et al., *The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments*. Lancet, 2011. **378**(9793): p. 804-14.

75. Ratziu, V., et al., *A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference*. J Hepatol, 2010. **53**(2): p. 372-84.
76. Younossi, Z.M., et al., *Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2011. **9**(6): p. 524-530 e1; quiz e60.
77. Chalasani, N., et al., *The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association*. Hepatology, 2012. **55**(6): p. 2005-23.
78. Blachier, M., et al., *The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data*. J Hepatol, 2013. **58**(3): p. 593-608.
79. Kanuri, G. and I. Bergheim, *In Vitro and in Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)*. Int J Mol Sci. **14**(6): p. 11963-80.
80. Day, C.P. and O.F. James, *Steatohepatitis: a tale of two "hits"?* Gastroenterology, 1998. **114**(4): p. 842-5.
81. Byrne, C.D., et al., *Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(7): p. 539-64.
82. Chitturi, S. and G.C. Farrell, *Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis*. Semin Liver Dis, 2001. **21**(1): p. 27-41.
83. Charlton, M., et al., *Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2002. **35**(4): p. 898-904.
84. Neuschwander-Tetri, B.A., *A resistance movement in NASH*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(10): p. 2813-4.
85. Gariani, K., J. Philippe, and F.R. Jornayvaz, *Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: from bench to bedside*. Diabetes Metab, 2013. **39**(1): p. 16-26.
86. Daly, A.K., *Relevance of CYP2E1 to non-alcoholic fatty liver disease*. Subcell Biochem. **67**: p. 165-75.
87. Robertson, G., I. Leclercq, and G.C. Farrell, *Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(5): p. G1135-9.
88. Esterbauer, H., R.J. Schaur, and H. Zollner, *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. Free Radic Biol Med, 1991. **11**(1): p. 81-128.

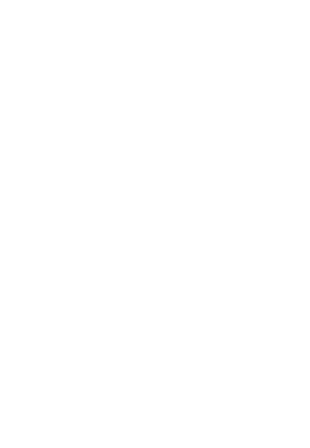
89. Hui, J.M., et al., *Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin?* Hepatology, 2004. **40**(1): p. 46-54.
90. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis.* Hepatology. **52**(5): p. 1836-46.
91. Racanelli, V. and B. Rehermann, *The liver as an immunological organ.* Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S54-62.
92. Seki, E. and D.A. Brenner, *Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update.* Hepatology, 2008. **48**(1): p. 322-35.
93. Gao, B., W.I. Jeong, and Z. Tian, *Liver: An organ with predominant innate immunity.* Hepatology, 2008. **47**(2): p. 729-36.
94. Thomson, A.W. and P.A. Knolle, *Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment.* Nat Rev Immunol. **10**(11): p. 753-66.
95. Tosello-Trampont, A.C., et al., *Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor-alpha production.* J Biol Chem, 2012. **287**(48): p. 40161-72.
96. Csak, T., et al., *Deficiency in myeloid differentiation factor-2 and toll-like receptor 4 expression attenuates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **300**(3): p. G433-41.
97. Gao, B., *Innate immunity and steatohepatitis: a critical role of another toll (TLR-9).* Gastroenterology, 2010. **139**(1): p. 27-30.
98. Rivera, C.A., et al., *Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis.* J Hepatol, 2007. **47**(4): p. 571-9.
99. Bertola, A., et al., *Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients.* PLoS One. **5**(10): p. e13577.
100. Kim, K.A., et al., *High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway.* PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47713.
101. Miura, K., et al., *Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice.* Gastroenterology. **139**(1): p. 323-34 e7.
102. Huang, W., et al., *Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance.* Diabetes. **59**(2): p. 347-57.

103. Szabo, G., et al., *Modulation of non-alcoholic steatohepatitis by pattern recognition receptors in mice: the role of toll-like receptors 2 and 4*. Alcohol Clin Exp Res, 2005. **29**(11 Suppl): p. 140S-145S.
104. Nguyen, M.T., et al., *A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways*. J Biol Chem, 2007. **282**(48): p. 35279-92.
105. Pennings, M., et al., *Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development*. FEBS Lett, 2006. **580**(23): p. 5588-96.
106. Bieghs, V., et al., *Internalization of modified lipids by CD36 and SR-A leads to hepatic inflammation and lysosomal cholesterol storage in Kupffer cells*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e34378.
107. Bieghs, V., et al., *Role of scavenger receptor A and CD36 in diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice*. Gastroenterology. **138**(7): p. 2477-86, 2486 e1-3.
108. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 175-84.
109. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest. **122**(3): p. 787-95.
110. Stienstra, R., et al., *Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity*. Hepatology. **51**(2): p. 511-22.
111. Lynch, L., et al., *Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production*. Immunity. **37**(3): p. 574-87.
112. Bronte, V. and P. Zanovello, *Regulation of immune responses by L-arginine metabolism*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 641-54.
113. Kim, H.J., et al., *Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo*. Diabetes, 2004. **53**(4): p. 1060-7.
114. Lumeng, C.N., et al., *Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity*. Diabetes, 2007. **56**(1): p. 16-23.

115. Fujisaka, S., et al., *Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice*. Diabetes, 2009. **58**(11): p. 2574-82.
116. Tamura, Y., et al., *C-C chemokine receptor 2 inhibitor improves diet-induced development of insulin resistance and hepatic steatosis in mice*. J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(3): p. 219-28.
117. Marra, F. and F. Tacke, *Roles for Chemokines in Liver Disease*. Gastroenterology. **147**(3): p. 577-594 e1.
118. Haukeland, J.W., et al., *Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2*. J Hepatol, 2006. **44**(6): p. 1167-74.
119. Bigorgne, A.E., et al., *Obesity-induced lymphocyte hyperresponsiveness to chemokines: a new mechanism of Fatty liver inflammation in obese mice*. Gastroenterology, 2008. **134**(5): p. 1459-69.
120. Elgazar-Carmon, V., et al., *Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding*. J Lipid Res, 2008. **49**(9): p. 1894-903.
121. Talukdar, S., et al., *Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase*. Nat Med. **18**(9): p. 1407-12.
122. Rensen, S.S., et al., *Increased hepatic myeloperoxidase activity in obese subjects with nonalcoholic steatohepatitis*. Am J Pathol, 2009. **175**(4): p. 1473-82.
123. Wu, D., et al., *Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis*. Science. **332**(6026): p. 243-7.
124. Liu, J., et al., *Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 940-5.
125. Henning, J.R., et al., *Dendritic cells limit fibroinflammatory injury in nonalcoholic steatohepatitis in mice*. Hepatology. **58**(2): p. 589-602.
126. Tacke, F. and H. Yoneyama, *From NAFLD to NASH to fibrosis to HCC: role of dendritic cell populations in the liver*. Hepatology. **58**(2): p. 494-6.
127. Parker, G.A. and C.A. Picut, *Liver immunobiology*. Toxicol Pathol, 2005. **33**(1): p. 52-62.
128. Wu, H., et al., *T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity*. Circulation, 2007. **115**(8): p. 1029-38.
129. Winer, S., et al., *Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 921-9.

130. Maher, J.J., P. Leon, and J.C. Ryan, *Beyond insulin resistance: Innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2008. **48**(2): p. 670-8.
131. Rocha, V.Z., et al., *Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity*. Circ Res, 2008. **103**(5): p. 467-76.
132. Kintscher, U., et al., *T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(7): p. 1304-10.
133. Nishimura, S., et al., *CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 914-20.
134. Barbi, J., D. Pardoll, and F. Pan, *Metabolic control of the Treg/Th17 axis*. Immunol Rev. **252**(1): p. 52-77.
135. Zhao, L., K. Qiu de, and X. Ma, *Th17 cells: the emerging reciprocal partner of regulatory T cells in the liver*. J Dig Dis. **11**(3): p. 126-33.
136. Tang, Y., et al., *Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease*. Clin Exp Immunol, 2011. **166**(2): p. 281-90.
137. Sumarac-Dumanovic, M., et al., *Increased activity of interleukin-23/interleukin-17 proinflammatory axis in obese women*. Int J Obes (Lond), 2009. **33**(1): p. 151-6.
138. Kawasaki, K., et al., *Blockade of B-cell-activating factor signaling enhances hepatic steatosis induced by a high-fat diet and improves insulin sensitivity*. Lab Invest. **93**(3): p. 311-21.
139. Xia, S., et al., *Gr-1+ CD11b+ myeloid-derived suppressor cells suppress inflammation and promote insulin sensitivity in obesity*. J Biol Chem. **286**(26): p. 23591-9.
140. Atwood, J.A., 3rd, et al., *The Trypanosoma cruzi proteome*. Science, 2005. **309**(5733): p. 473-6.
141. WHO, *Cardiovascular diseases (CVDs)*. 2011.
142. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
143. Li, A.C. and C.K. Glass, *The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1235-42.
144. Maiellaro, K. and W.R. Taylor, *The role of the adventitia in vascular inflammation*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(4): p. 640-8.

145. Moos, M.P., et al., *The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(11): p. 2386-91.
146. Wu, K.K., et al., *Increased hypercholesterolemia and atherosclerosis in mice lacking both ApoE and leptin receptor*. *Atherosclerosis*, 2005. **181**(2): p. 251-9.
147. Sunnemark, D., et al., *Induction of early atherosclerosis in CBA/J mice by combination of Trypanosoma cruzi infection and a high cholesterol diet*. *Atherosclerosis*, 2000. **153**(2): p. 273-82.
148. Rosenfeld, M.E. and L.A. Campbell, *Pathogens and atherosclerosis: update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis*. *Thromb Haemost*, 2011. **106**(5): p. 858-67.
149. Hayashi, C., et al., *Pathogen-mediated inflammatory atherosclerosis is mediated in part via Toll-like receptor 2-induced inflammatory responses*. *J Innate Immun*, 2010. **2**(4): p. 334-43.
150. Giacona, M.B., et al., *Porphyromonas gingivalis induces its uptake by human macrophages and promotes foam cell formation in vitro*. *FEMS Microbiol Lett*, 2004. **241**(1): p. 95-101.
151. Bestetti, R.B., et al., *Clinical characteristics of acute myocardial infarction in patients with Chagas' disease*. *Int J Cardiol*, 1992. **35**(3): p. 371-6.
152. Lopes, E.R., et al., *[Coronary arteriosclerosis and myocardial infarction in chronic Chagas' disease]*. *Arq Bras Cardiol*, 1995. **65**(2): p. 143-5.
153. Berrisbetia M, M.M., Jonquera A, Blanco A, Pozo A, Geraldino O. , *Niveles de lipoproteínas, colesterol y triglicéridos en individuos en la fase indeterminada y crónica de la enfermedad de Chagas*. *Bol Malariol Sal Amb* 2007. **47** p. Supl. 1): 155.
154. Alarcón M, A.N., Calderón L, Matousek A. , *Evaluación de la ingesta de colesterol en conejos infectados con Trypanosoma cruzi*. *Infect Immunol*, 2004. **72**: 3571-3576.
155. Feig, J.E., et al., *LXR promotes the maximal egress of monocyte-derived cells from mouse aortic plaques during atherosclerosis regression*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(12): p. 4415-24.
156. Khallou-Laschet, J., et al., *Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis*. *PLoS One*, 2010. **5**(1): p. e8852.



157. Pourcet, B., et al., *LXRalpha regulates macrophage arginase 1 through PU.1 and interferon regulatory factor 8*. *Circ Res*, 2011. **109**(5): p. 492-501.
158. Thomas, A.C., et al., *Genomics of foam cells and nonfoamy macrophages from rabbits identifies arginase-1 as a differential regulator of nitric oxide production*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(3): p. 571-7.
159. Munder, M., *Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system*. *Br J Pharmacol*, 2009. **158**(3): p. 638-51.
160. Pesce, J.T., et al., *Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(4): p. e1000371.
161. Tedgui, A. and Z. Mallat, *Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(2): p. 515-81.
162. Qiao, J.H., et al., *Immune-complex-mediated vasculitis increases coronary artery lipid accumulation in autoimmune-prone MRL mice*. *Arterioscler Thromb*, 1993. **13**(6): p. 932-43.
163. Han, J., et al., *Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(34): p. 21654-9.
164. Manning-Tobin, J.J., et al., *Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(1): p. 19-26.
165. de Boer, O.J., A.E. Becker, and A.C. van der Wal, *T lymphocytes in atherogenesis-functional aspects and antigenic repertoire*. *Cardiovasc Res*, 2003. **60**(1): p. 78-86.
166. Major, A.S., S. Fazio, and M.F. Linton, *B-lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(11): p. 1892-8.
167. Mallat, Z., et al., *Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice*. *Circulation*, 2003. **108**(10): p. 1232-7.
168. Schulte, S., G.K. Sukhova, and P. Libby, *Genetically programmed biases in Th1 and Th2 immune responses modulate atherogenesis*. *Am J Pathol*, 2008. **172**(6): p. 1500-8.
169. Olson, N.C., et al., *T helper cell polarization in healthy people: implications for cardiovascular disease*. *J Cardiovasc Transl Res*, 2013. **6**(5): p. 772-86.

170. Zhao, L., et al., *The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm*. Nat Med, 2004, **10**(9): p. 966-73.
171. Ketelhuth, D.F. and G.K. Hansson, *Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: break of tolerance in the artery wall*. Thromb Haemost, 2011, **106**(5): p. 779-86.
172. Mallat, Z., et al., *Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis*. Circ Res, 1999, **85**(8): p. e17-24.
173. Pinderski Oslund, L.J., et al., *Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, **19**(12): p. 2847-53.
174. Sunnemark, D., et al., *Cellular and cytokine characterization of vascular inflammation in CBA/J mice chronically infected with Trypanosoma cruzi*. Scand J Immunol, 1998, **48**(5): p. 480-4.
175. Jin, C. and R.A. Flavell, *Innate sensors of pathogen and stress: linking inflammation to obesity*. J Allergy Clin Immunol, 2013, **132**(2): p. 287-94.
176. Higashimori, M., et al., *Role of toll-like receptor 4 in intimal foam cell accumulation in apolipoprotein E-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, **31**(1): p. 50-7.
177. Bjorkbacka, H., et al., *Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways*. Nat Med, 2004, **10**(4): p. 416-21.
178. Michelsen, K.S., et al., *Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, **101**(29): p. 10679-84.
179. Choi, S.H., et al., *Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake*. Circ Res, 2009, **104**(12): p. 1355-63.
180. Moser, D.R., L.V. Kirchhoff, and J.E. Donelson, *Detection of Trypanosoma cruzi by DNA amplification using the polymerase chain reaction*. J Clin Microbiol, 1989, **27**(7): p. 1477-82.
181. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001, **25**(4): p. 402-8.

