

Proyecto final de Ingeniería.

**EVALUACIÓN DE FACTORES DEL SISTEMA DE  
COMPLEMENTO EN PACIENTES CON ENFERMEDAD  
DE CHAGAS CRÓNICA**

**Guido Federico Infante Ferrari- LU.1019471**

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

**Dra. Albareda, Cecilia, INP Dr. M Fatala Chaben**

Co-Tutor:

**Dra. Diana María Acosta, UADE**

**2021**

**UADE**

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

**Índice.**

<b>1. Introducción.....</b>	<b>4</b>
1.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas.....	4
1.2 Agente causal de la enfermedad.....	4
1.3 Diagnósticos de la enfermedad de Chagas.....	6
1.4 Estadios clínicos de la enfermedad de Chagas.....	7
1.4.1 Etapa aguda.....	7
1.4.2 Etapa crónica.....	8
1.5 Clasificación de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica.....	8
1.6 Patogénesis de la enfermedad de Chagas.....	9
1.7 Tratamiento de la enfermedad de Chagas.....	10
1.8 Generalidades de la respuesta inmune innata y adaptativa durante una infección .....	11
1.8.1 Desarrollo de la respuesta de las células T y el fenómeno de agotamiento de la respuesta inmune en pacientes crónicos de la enfermedad de Chagas.....	12
1.9 Sistema del complemento .....	13
1.9.1 Respuesta del sistema del complemento frente al <i>T.cruzi</i> .....	15
1.10 Hipótesis.....	17
1.11 Objetivo general.....	17

1.12 Objetivos específicos.....	18
<b>2. Materiales y métodos.....</b>	<b>19</b>
2.1 Actividades y metodología.....	19
2.2 Selección de la población de estudio.....	19
2.3 Obtención de muestras.....	20
2.4 Determinación de los niveles de C3a y C5a.....	21
2.5 Determinación de la expresión de los receptores C3a y C5a y las moléculas regulatorias en la población de linfocitos T.....	21
2.6 Análisis estadísticos.....	22
<b>3. Resultados.....</b>	<b>23</b>
3.1 Niveles de C3a y C5a en sueros de pacientes crónicamente infectados con <i>T. cruzi</i> .....	23
3.2 Análisis de los receptores C3aR y C5aR en población total de linfocitos T.....	24
3.3 Análisis de la expresión de las moléculas regulatorias CD35, CD46 y CD55 en la población de linfocitos T.....	26
<b>4. Conclusiones.....</b>	<b>29</b>
<b>5. Bibliografía.....</b>	<b>32</b>

## 1. Introducción.

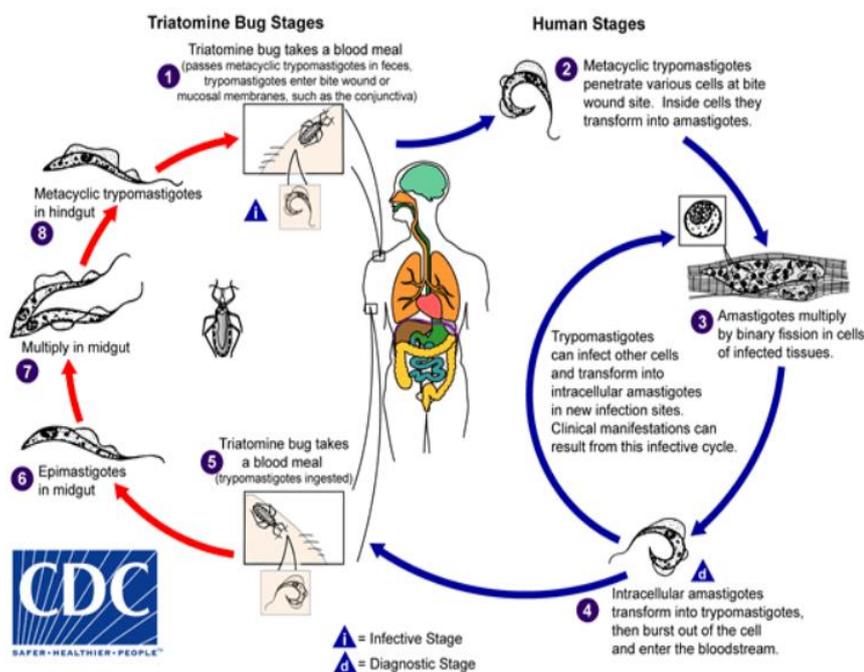
### 1.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y fue descrita por primera vez por Carlos Chagas (1879-1934) en 1909 en Minas Gerais, Brasil. Esta enfermedad constituye una de las causas más importantes de morbimortalidad en nuestro país y el resto de Latinoamérica. Aproximadamente 6 millones de individuos se encuentran afectados por el *T. cruzi*, siendo el desarrollo de alteraciones cardíacas y/o digestivas, las principales manifestaciones de la enfermedad (WHO, 2021; Rassi A y col.,1979). Debido a los procesos migratorios, la enfermedad de Chagas también se encuentra en áreas no endémicas, como los Estados Unidos y Europa occidental (Bern, 2007; Piron, 2008).

### 1.2 Agente causal de la enfermedad de Chagas

El *Trypanosoma cruzi* es un parásito intracelular obligado, cuyo ciclo de vida alterna entre un huésped invertebrado, el insecto triatomino hematófago perteneciente a la familia Reduviidae, y un huésped vertebrado. El área de prevalencia de la enfermedad de Chagas se superpone con el área de distribución geográfica del vector, extendiéndose desde el paralelo 40° de latitud Norte en el sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta el paralelo 45° de latitud sur en la Argentina y Chile (Zeledón R, 1972; Burkholder, 1980). El ciclo de vida del parásito comprende tres estadios de diferenciación: epimastigote, amastigote y tripomastigote, con formas intermedias que también han sido descritas. En la naturaleza el parásito se transmite por vía vectorial o congénita y la enfermedad también se transmite mediante transfusiones de sangre, donación de órganos y accidentes de laboratorio. La transmisión vectorial ocurre cuando el insecto, luego de alimentarse sobre el huésped vertebrado, libera tripomastigotes metacíclicos en las heces, los cuales son introducidos mecánicamente durante el acto de rascado en el sitio de la picadura, o

penetran activamente a través de una herida en la piel o las mucosas. Los tripomastigotes invaden las células nucleadas en el sitio de entrada al organismo y se diferencian luego en amastigotes, que es la forma replicativa del parásito dentro de las células de mamíferos. Luego de varios ciclos de replicación dentro del citoplasma celular, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes y al destruir la célula son liberados al torrente sanguíneo pudiendo infectar otras células nucleadas o ser ingeridos por el vector. En el vector, los tripomastigotes sanguíneos se transforman en epimastigotes en la región posterior del intestino. Los epimastigotes son las formas replicativas en el insecto vector, responsables del mantenimiento de la infección en el huésped invertebrado. Los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en el recto de los insectos, los cuales son eliminados con las heces durante, o inmediatamente después, de la alimentación, reiniciándose nuevamente el ciclo de vida del parásito (Santos- Buch, 1985; Fig. 1)



**Figura 1:** Ciclo de vida del *T. cruzi* (Adquirida de Center for Disease Control and Prevention (CDC)).

Diferentes estudios mostraron que el *T. cruzi* es una especie heterogénea, y que tanto el desarrollo de lesiones inflamatorias en los tejidos como el parasitismo intracelular, son dependientes del aislamiento parasitario y del huésped (Postan M y col., 1983, 1987). La distribución diferencial del *T. cruzi* en los tejidos, se relaciona con las diferencias genéticas del parásito, demostrada por los patrones diferenciales de kADN descritos en corazón y esófago de pacientes con enfermedad de Chagas crónica que presentan patologías cardíacas y/o digestivas (Vago AR y col., 2000).

### **1.3 Diagnósticos de la enfermedad de Chagas.**

El diagnóstico de laboratorio para la enfermedad de Chagas se basa en ensayos que detectan la presencia de anticuerpos contra antígenos del parásito o mediante ensayos directos que detectan al parásito (presencia de tripomastigotes en sangre periférica o en muestras de tejido). Para esta última vía de detección, se pueden utilizar métodos directos mediante el uso de microscopios ópticos luego de la expansión parasitaria a través del cultivo in vitro o también pasaje en animales de laboratorio. Los altos niveles de parásitos circundantes, en la fase aguda de la infección permiten la detección de estos mediante métodos directos como la gota fresca o el método de Strout (Strout RG, 1962). En la etapa crónica de la enfermedad debido a la baja carga parasitaria en sangre periférica, los métodos parasitológicos directos utilizados durante la fase aguda no son útiles para el diagnóstico. Por lo tanto, se utilizan métodos serológicos que se basan en la detección de anticuerpos contra antígenos del parásito. Los ensayos que actualmente se utilizan son: inmunoensayo enzimático (ELISA), hemaglutinación indirecta (HAI) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Estos ensayos permiten cuantificar la presencia de anticuerpos específicos contra *T. cruzi*. Cuando dos de estas pruebas resultan positivas se considera que el individuo está infectado (TDR/WHO 2012; Ministerio de Salud de Argentina 2018). La técnica de cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa para analizar la presencia de ADN parasitario en individuos presuntamente infectados es muy útil en el diagnóstico de casos agudos (por transmisión oral o trasplante) y de transmisión congénita luego de los 30 días del nacimiento, aunque no esté incluida aún como análisis de rutina

(Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chabén. Informe Técnico: Implementación de PCR en Tiempo Real en el Diagnóstico de Infección Vertical por *Trypanosoma cruzi*). En el caso de pacientes adultos con infección crónica resulta difícil la detección de ADN del parásito, ya que el número en circulación es muy bajo. En estos casos, esta técnica se utiliza como evidencia de falla terapéutica (Britto 2009; Schijman 2011).

#### **1.4 Estadios clínicos de la enfermedad de Chagas.**

La enfermedad de Chagas comprende una etapa aguda donde existe un bajo índice de mortalidad y una segunda etapa denominada crónica sintomática con compromiso miocardio y/o intestinal progresivo. Ambas etapas se encuentran separadas por un periodo clínicamente asintomático cuya duración es variable. Cada una de las etapas mencionadas anteriormente, posee aspectos clínicos, histopatológicos y parasitológicos diferentes, aunque no todos se presentan necesariamente en todos los individuos infectados con el parásito.

##### **1.4.1 Etapa aguda.**

La fase aguda dura de 4 a 8 semanas y los síntomas y signos son inespecíficos y pueden incluir fiebre, inflamación en el sitio de inoculación (Chagoma de Inoculación), edema palpebral unilateral (signo de Romaña), linfadenopatía y hepatoesplenomegalia (Laranja FS, 1956; Wegner DH, 1972). La enfermedad aguda severa ocurre en menos del 1 al 5% de los pacientes e incluye manifestaciones como miocarditis aguda, derrame pericárdico y meningoencefalitis (riesgo de mortalidad 0,2-0,5%) (Laranja FS, 1956; Pinto AY, 2008). La mayoría de los recién nacidos infectados congénitamente no presentan signos y síntomas de la enfermedad, pero una minoría puede presentar signos y síntomas graves (Bittencourt AL, 1975). La transmisión oral parece causar una enfermedad más severa,

con una mortalidad más alta que la enfermedad transmitida por vectores (Alarcón de Noya B, 2010; Shikanai-Yasuda MA, 2012).

### **1.4.2 Etapa Crónica.**

Una vez que la fase aguda se resuelve, los individuos entran en una fase crónica de la enfermedad. Esta forma clínica se la denomina etapa crónica sin patología evidente de la enfermedad de Chagas (Mitelman JE, 2011), dado que no presentan signos o síntomas clínicos de compromiso cardíaco o digestivo, y radiografía de tórax y electrocardiograma normales (Dias JC, 1989, Mitelman JE, 2011). Un 20-30% de los pacientes desarrollará una forma de la enfermedad con patología evidente (Mitelman JE, 2011), ya sea cardíaca, digestiva (principalmente megaesófago y megacolon), o cardiodigestiva, usualmente dentro de los 10 a 30 años de la infección inicial. El compromiso cardíaco es la manifestación más frecuente y de mayor relevancia en Argentina (Mazza S. 1941). Existen evidencias de otras indicaciones menos frecuentes del tipo de desorden neurológicos y problemas digestivos (Koberle F 1968 y Sica RE y col., 1986; Losavio A y col., 1989).

### **1.5 Clasificación de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica.**

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

-Grupo 0 (G0): Pacientes asintomáticos con radiografías de tórax, ecocardiogramas y electrocardiogramas normales.

-Grupo 1 (G1): Pacientes con radiografías de tórax y ecocardiogramas normales, pero con alteraciones electrocardiográficas leves, tales como bloqueo de rama derecha y hemibloqueo anterior o posterior izquierdo, extrasístoles ventriculares polifocales o con formas repetitivas y taquicardia ventricular sostenida y/o fibrilación ventricular.

-Grupo 2 (G2): Pacientes que presentan cardiomegalia en las radiografías de tórax y alteraciones electrocardiográficas y ecocardiograma más severas tales como bloqueo auriculo ventricular de 2do grado.

-Grupo 3 (G3): Pacientes con alteraciones electrocardiográficas severas, cardiomegalias y signos clínicos y radiológicos de insuficiencia cardíaca con evidencias de lesión miocárdica.

## **1.6 Patogénesis de la enfermedad de Chagas.**

Se desconocen aún los procesos que gobiernan la fisiopatología de la enfermedad de Chagas. Hasta hace algunos años se sugería que la enfermedad de Chagas tenía una etiología autoinmune (Borda 1984; Masuda 1998; Labovsky 2007), sin embargo, actualmente hay suficiente evidencia que indica que la persistencia del parásito es requerida para el desarrollo de la enfermedad. El empleo de técnicas de elevada sensibilidad para la detección del parásito, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ensayos de inmunohistoquímica para detectar antígenos parasitarios, ha permitido demostrar la persistencia del *T. cruzi*, o fragmentos del mismo en el miocardio siendo así el estímulo para la respuesta inflamatoria crónica (Higuchi 1993; Reis 1993; Tarleton 1994; Tarleton, Zhang y Downs 1997; Jones EM, 1993). Sin embargo, cabe destacar que se ha descrito la existencia de reactividad cruzada entre antígenos del parásito y del huésped (López Bergami P, 2001; Smulski C, 2006, Gironés 2005), un mecanismo que podría ser responsable de fenómenos de hipersensibilidad hacia componentes propios de huésped. También se sostiene que las alteraciones de la microcirculación podrían ser responsables de la inducción del daño cardíaco (Koberle F 1974; Tanowitz HB 1992, 2005.). Otro factor igualmente importante es el grado de

efectividad de la respuesta inmune del huésped para controlar la replicación del parásito. Estos dos factores están relacionados mutuamente. Uno de los mecanismos por el cual la persistencia del parásito podría afectar la respuesta inmune específica requerida para controlar la infección, es a través de un proceso de agotamiento inmunológico que podría ser el causante de un daño tisular acumulativo debido a la disfuncionalidad que poseen los linfocitos T agotados (Laucella 2004; Albareda 2006; Gutierrez 2009; Egui 2019; Longui S 2014). Otros autores han planteado que la patología cardíaca se originaría como consecuencia de un desbalance de la respuesta inmune que sería incapaz de controlar el daño generado por una respuesta inmune sostenida (Dutra WO, 2014).

## **1.7 Tratamiento de la enfermedad de Chagas.**

Los medicamentos que se utilizan en la actualidad para tratar la enfermedad de Chagas son el benznidazol y el nifurtimox. Ambos son tripanocidas y actúan sobre todas las formas del parásito (Maya JD, 1997, 2007; Urbina JA, 2010). El benznidazol y el nifurtimox actúan a través de la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos, que afectan a todas las macromoléculas del parásito (Maya JD, 2003).

El tratamiento es recomendado durante la etapa aguda, en los casos de transmisión congénita, en la que se ha demostrado una alta efectividad al realizar el tratamiento durante el primer año de vida (Russomando 1998; Altcheh 2003), en niños y jóvenes hasta 19 años de edad y para mujeres en edad fértil donde se ha probado que previene la transmisión al bebé (Sosa-Estani 2009; Moscatelli 2015; Murcia 2017; Álvarez 2017; Ministerio de Salud de Argentina 2018).

## **1.8 Generalidades de la respuesta inmune innata y adaptativa durante una infección.**

Las reacciones de defensa del huésped frente a un agente invasor son variadas y numerosas, donde se involucran mecanismos efectores correspondientes a las respuestas inmunes innatas y adaptativas que actúan de manera especializada según el tipo de patógeno que invade al huésped. La persistencia y la patogenicidad del microorganismo son críticamente influenciadas por la efectividad de la respuesta inmune del huésped y por la habilidad del microorganismo para eludir o resistir los mecanismos efectores del sistema inmune.

La primera línea de defensa del huésped frente a una infección, se encuentra compuesta por los mecanismos efectores de la respuesta innata, donde los principales componentes son: a) barreras físicas y químicas tales como el epitelio y sustancias anti microbicidas generadas por la superficie epitelial, b) proteínas de la sangre que incluyen componentes del sistema de complemento y otros mediadores de inflamatorios, c) células fagocíticas, tales como los neutrófilos y macrófagos y d) citoquinas proinflamatorias. Debemos aclarar, que los mecanismos de la inmunidad innata accionan sobre estructuras comunes a grupos de microorganismos relacionados, carentes de la capacidad de distinguir diferencias sutiles entre sustancias extrañas.

A diferencia de la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa es dependiente y específica del antígeno que le dio origen y, por lo tanto, precisa de un tiempo para desarrollarse entre la primera exposición al antígeno y la respuesta. Los linfocitos T vírgenes específicos para una gran cantidad de antígenos existen en un bajo número y su activación requiere del reconocimiento de los péptidos presentados por las células presentadoras de antígenos (por ejemplo, células dendríticas, monocitos, macrófagos).

El reconocimiento de los antígenos y las señales coestimuladoras desencadenan la proliferación y diferenciación de los linfocitos T específicos para el antígeno. A este proceso se lo denomina “expansión clonal”, que culmina con el aumento de la frecuencia de células antígeno-específicas y la adquisición de funciones efectoras por parte de las células T y la consecuente eliminación del patógeno. Posteriormente, la población T

específica disminuye su frecuencia entrando en una fase de contracción y recuperando su estado basal de reposo mediante mecanismos de homeostasis. El sello distintivo de la inmunidad adaptativa es la capacidad de memoria que permite al huésped montar una respuesta inmune más rápida y eficiente en una reexposición al antígeno.

### **1.8.1 Desarrollo de la respuesta de las células T y el fenómeno de agotamiento de la respuesta inmune en pacientes crónicos de la enfermedad de Chagas**

Dado que el *T. cruzi* presenta dos estadios de desarrollo anatómico diferentes en el hospedador mamífero, tripomastigotes en circulación y amastigotes en el citoplasma de las células infectadas, el control inmunitario del parásito requiere la generación de respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas. Sin embargo, incluso en los casos en que esas respuestas inmunes son suficientes para controlar la infección aguda, el parásito no se elimina por completo, lo que resulta en una infección crónica (Tarleton, 2007). La persistencia de estas respuestas inflamatorias puede eventualmente resultar en el daño tisular que se encuentra en las personas con infección crónica por *T. cruzi* (Tarleton, 2001). Estos datos también respaldan la hipótesis de que una buena respuesta inmune que limite de manera eficiente la carga de parásitos en los tejidos debería dar como resultado una enfermedad menos grave.

Distintos grupos de investigación han realizado un análisis de la respuesta celular T específica hacia *T. cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, tanto en adultos (Laucella 2004; Albareda 2009; Egui 2015, Acevedo 2019, Abel 2001; Gomes 2003; Cuellar 2009; Guedes 2012; Longhi 2014) como en niños (Sathler-Avelar 2006, Albareda 2013). Uno de los hallazgos más importantes ha sido la observación que la infección crónica por *T. cruzi* conduciría a la respuesta celular T específica para el parásito a un estado de agotamiento inmunológico, característico de las infecciones persistentes tanto virales (Virgin, Wherry y Ahmed 2009; Wherry 2015) como parasitarias (Zander y Butler 2013, López 2019). La capacidad funcional de linfocitos T en pacientes adultos con

enfermedad de Chagas crónica se asoció inversamente con el grado de compromiso cardíaco (Laucella 2004; Albareda 2006; Albareda 2009, Perez Antón 2020, Egui A 2015). En cambio, a partir de los estudios realizados en niños infectados con *T. cruzi*, quienes presuntamente tendrían un tiempo más corto de infección, la respuesta celular T específica para *T. cruzi* presenta una mayor capacidad polifuncional y de mayor magnitud (Albareda 2013, 2018) comparado con pacientes adultos. Se ha demostrado también, que las poblaciones de linfocitos T totales se encuentran enriquecidas en células con alto grado de diferenciación, (Albareda 2006, Albareda 2009, Egui 2015), alteraciones en el eje IL7/IL7R (Albareda 2015, Natale 2018) y alta dependencia de la presencia de antígeno para el mantenimiento de células T y aumento de la expresión de receptores inhibitorios en las células T (Lasso 2015; Perez-Anton 2018). Otros autores han observado que la producción de IL-10 se asocia a estadios clínicos con menor compromiso cardíaco en niños (Samudio 1998; Sathler-Avelar 2006) y adultos (Gomes 2003; Guedes 2012; Gomes 2014) infectados con *T. cruzi*, y una mayor producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a *T. cruzi* en pacientes con miocardiopatía severa comparados con individuos sin signos de enfermedad cardíaca (Abel 2001; Gomes 2003; Cuellar 2009; Guedes 2012; de Araújo 2012). Es importante señalar que, si bien estas células T pueden ser efectivas para controlar la infección en sujetos crónicamente infectados con *T. cruzi*, mientras la eficiencia de la respuesta inmune disminuya, la capacidad de controlar la carga parasitaria sin aumentar el nivel del daño tisular podría disminuir.

### **1.9 Sistema del complemento.**

Independientemente de la vía utilizada (vía clásica, alternativa y de la lectina), la activación del sistema del complemento da como resultado la generación de las convertasas C3 y C5 que se escinden en las principales moléculas efectoras, las anafilotoxinas C3a y C5a y las opsoninas C3b y C5b. Las moléculas C3a y C5a inducen funciones efectoras pleiotrópicas al unirse a sus receptores específicos C3aR y C5aR1/2, respectivamente (Klos et al., 2009), C5b conduce a la formación del complejo de ataque a membrana (MAC) y C3b está relacionado con la fagocitosis de los objetivos

opsonizados (Ricklin et al. 2010). El equilibrio entre la activación y la inhibición del sistema del complemento es esencial para proteger a las células del daño inducido por un nivel indiscriminado de respuesta inmune. La activación del complemento está finamente regulada por proteínas reguladoras del complemento (Cregs), que incluyen proteínas solubles (inhibidor de C1, factor H y proteína de unión a C4b) y proteínas asociadas a la membrana (CD46, CD55, CR1 o CD35 y CD59), que regulan la activación de la cascada del complemento, principalmente en la etapa de convertasa C3 (Arbore et al., 2017; Ricklin et al., 2016; Kim et al., 2006; Zipfel y Skerka, 2009).

El sistema del complemento generalmente se considera como un sistema de proteínas, circulantes en suero y unidas a membrana, donde el hígado es la fuente principal de sus componentes y siendo la función principal la detección y eliminación de patógenos circulantes como parte de la respuesta inmune innata (Ricklin et al, 2010). Sin embargo, más recientemente, los hallazgos de que la mayoría de las células del sistema inmune pueden producir proteínas del complemento y expresar sus receptores, han llevado a la noción de que el sistema del complemento también posee funciones no canónicas en la respuesta inmunitaria (Klos et al., 2009; Ricklin et al., 2010; Killick et al., 2018). Este sistema del complemento intracelular se denominó complosoma para diferenciarlo del sistema del complemento derivado del hígado y del suero circulante (Killick et al., 2018).

Las moléculas del complemento podrían actuar directa o indirectamente sobre las células T, ya sea promoviendo o inhibiendo las respuestas inmunitarias (Clarke et al., 2014; Moro-García et al., 2018; Heeger and Kemper, 2012; Liszewski et al., 2017; West et al. 2018). Con respecto a los efectos indirectos, la emisión de señales después de la activación de C3aR y C5aR mediante la unión de C3a y C5a, respectivamente, induce a la maduración de células presentadoras de antígeno (es decir, células dendríticas, macrófagos y monocitos) mediante la secreción de interleucina IL-12, regulación que induce a la generación del complejo principal de histocompatibilidad 2 (MHC II) necesario para la emisión de una efectiva respuesta Th1 (Kemper C y Atkinson JP 2007). Por el contrario, la unión del C3R por la forma inactivada C3b (iC3b) en las células presentadoras de antígeno activa la producción de las citoquinas reguladoras IL-10 y TGF- $\beta$  que actúan como reguladores negativos de las respuestas de las células T (Sohn et

al. al 2003). En relación a los efectos directos del sistema del complemento en la función de las células T, después de la estimulación del antígeno, C3a y C3b se translocan a la membrana de las células T, donde se acoplan a sus receptores, C3aR y el coestimulador CD46 (West et al 2018), respectivamente. Estas interacciones median la reprogramación metabólica celular de las células T mediante la inducción del programa mTOR involucrado en la regulación positiva de la glucólisis aeróbica y el proceso de fosforilación oxidativa necesarios para la inducción de la respuesta Th1 (Figura 1; Liszewski et al., 2017; West et al. al., 2018). Además, existe una regulación negativa de la molécula reguladora CD55 que promueve aún más la diferenciación en células efectoras Th1 (Lalli et al., 2007). Por otro lado, la activación del receptor del complemento 1 (CR1) en las células T podría inhibir la producción y proliferación de IL-2, y promover la secreción de IL-10, lo que lleva a un cierre de la respuesta de las células T.

El sistema del complemento también está involucrado en la homeostasis de las células T a través de la unión de C3b a CD46 que promueve la expresión de IL7R (CD127) (Wofford et al 2008; Carrette and Surh 2012; Kolev et al 2014, Clarke and Tenner 2014). Existe una actividad metabólica basal del C3a/C5a intracelular y la vía de reciclaje del receptor que promueve la supervivencia de las células T a través de un bajo nivel de activación de mTOR (West y Kempel 2019).

En resumen, estos datos respaldan la interacción entre las moléculas efectoras del complemento y sus receptores, tanto en las células presentadoras de antígeno como en las células T, que podrían influir en el desarrollo de las respuestas de los linfocitos T en el contexto de la enfermedad de Chagas crónica y en el proceso de agotamiento.

### **1.9.1 Respuesta del sistema del complemento frente al *T.cruzi***

La mayoría de las personas infectadas por el *T. cruzi* permanecen asintomáticas durante toda su vida y las interacciones parásito-huésped parecen jugar un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad. Se cree que la inflamación en el corazón se desarrolla a lo

largo de los años a partir de procesos indolentes de bajo grado que dependen, al menos en parte, de los pocos parásitos que persisten en el corazón (Bonney et al., 2019), lo que induce una activación constante del sistema inmunitario. Pocos estudios han abordado el papel del sistema del complemento en la fase crónica de la infección por *T. cruzi*. Un estudio de Aiello et al. (2002) utilizando muestras miocárdicas congeladas de pacientes con enfermedad de Chagas crónica con miocardiopatía, detectó la presencia de parásitos en las necropsias cardíacas en relación con una mayor activación del sistema del complemento y a la formación del complejo de ataque de membrana.

De esta manera, la liberación de moléculas efectoras del complemento con funciones canónicas podría contribuir al desarrollo de formas sintomáticas de infección crónica por su efecto proinflamatorio y también incidir en la reacción inflamatoria continua debida a la persistencia del parásito en el corazón que conduce a la necrosis y fibrosis en los sujetos crónicamente infectados con el parásito. (Boldt et al., 2011; Weitzel et al., 2012; Luz et al., 2016). Por el contrario, otros estudios han descrito niveles elevados de C3a en el suero de sujetos con enfermedad de Chagas crónica asintomática, que respaldan un papel positivo del sistema del complemento en la infección crónica por *T. cruzi* (Ndao et al., 2010).

Un aumento de los mecanismos reguladores negativos o la activación inapropiada de señales positivas inducidas por las funciones no canónicas del sistema del complemento podrían participar en el proceso de agotamiento de las células T en la enfermedad de Chagas crónica promoviendo la eliminación de la respuesta de los linfocitos T específicos del parásito. Una deficiencia en la maduración de las células presentadoras de antígeno, una baja activación de la vía mTOR o la señalización de CD46 por una expresión deficiente de C3aR, C5aR, C3a, C3b y C5a, podrían inducir una pobre respuesta Th1. Un desequilibrio de las señales negativas sobre las positivas mediadas por el complemento inhibiría aún más las respuestas de las células T. La supervivencia de las células T homeostáticas también podría verse comprometida por una regulación negativa de C3aR, C5aR, C3a, C3b y C5a (Le Friec et al 2012, Clarke y Tenner, 2014).

Una mejor comprensión de los mecanismos reguladores del sistema del complemento en las respuestas de las células T podría proporcionar nuevos conocimientos sobre esta enfermedad parasitaria crónica.

### **1.10 Hipótesis**

Tradicionalmente, se ha considerado que la inmunidad innata presenta un rol crítico en etapas iniciales de una infección aguda, permitiendo el control del patógeno mientras se pone en marcha la respuesta adaptativa (Vivier E y col.,2011). Sin embargo, actualmente es sabido que muchos aspectos de la inmunidad innata influyen en la respuesta adaptativa. El sistema inmune innato puede modular la respuesta celular de linfocitos T en forma positiva o negativa y por lo tanto sería determinante para regular la inmunidad y desarrollo de patología inducida por patógenos.

Tal como observamos que ocurre en la población de linfocitos T, nuestra hipótesis es que la activación constante del sistema inmune podría inducir cambios en la expresión de las moléculas del sistema de complemento y podría haber una posible desregulación de los factores del sistema de complemento en los pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

### **1.11 Objetivo general**

El objetivo general de este proyecto es realizar una caracterización de los factores del sistema de complemento y sus receptores en muestras de pacientes con distintos estadios clínicos de la enfermedad de Chagas crónica.

### **1.11.1 Objetivos específicos.**

Con el fin de cumplir el objetivo general mencionado en el punto anterior, se evaluarán:

- 1) Los niveles séricos de las anafilotoxinas C3a y C5a.
- 2) La expresión de los receptores C3aR y C5aR1 y de las moléculas regulatorias CD35, CD55 y CD46 en la población de linfocitos T de sangre periférica.

## **2. Materiales y métodos.**

### **2.1 Actividades y metodología.**

El presente estudio propone realizar una caracterización de los factores del sistema de complemento en pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi* en distintos estadios clínicos de la enfermedad de Chagas. Se utilizaron muestras de sangre para aislar las células mononucleares periféricas y el suero. Para caracterizar la expresión de los receptores de las anafilotoxinas C3a y C5a y de las moléculas regulatorias del sistema de complemento en la población de linfocitos T se determinó la expresión con anticuerpos específicos para cada marcador utilizando la técnica policromática de citometría de flujo. Los niveles séricos de C3a y C5a se midieron utilizando la técnica de ELISA.

### **2.2 Selección de la población del estudio.**

Individuos adultos con serología positiva y negativa para la infección por *Trypanosoma cruzi* fueron incorporados en la Sección de Chagas del Hospital Interzonal de Agudos Eva Perón, Provincia de Buenos Aires, Argentina. El protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética del mencionado hospital. Los participantes adultos firmaron un consentimiento informado previamente a su inclusión en el estudio.

La infección por *T. cruzi* se determinó por las tres pruebas serológicas convencionales, IFI, HAI y ELISA (TDR/WHO 2012), realizadas en el Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chabén. Los pacientes con al menos dos pruebas serológicas positivas fueron considerados positivos (TDR/WHO 2012). A todos los individuos incluidos en el estudio se les realizó una evaluación física, electrocardiograma (ECG) y ecocardiograma para posteriormente determinar la forma clínica de acuerdo con la clasificación de Kuschnir modificada (Kuschnir 1985; Viotti 2011). Los participantes pertenecientes al Grupo 0 (G0) presentan un electrocardiograma, radiografía de tórax y ecocardiografía normales; los participantes pertenecientes al Grupo 1 (G1) presentan hallazgos normales en la radiografía de tórax y ecocardiografía, pero anomalías en el electrocardiograma;

los participantes del Grupo 2 (G2) presentan anomalías electrocardiográficas y agrandamiento del corazón; y los participantes del Grupo 3 (G3) presentan anomalías en el electrocardiograma, agrandamiento del corazón y evidencia clínica o radiológica de insuficiencia cardíaca. Para este trabajo se incluyeron un total de 37 adultos infectados por *T. cruzi* y 17 adultos no infectados en el mismo rango de edad (Tabla 1).

Tabla 1. Características de la población estudiada

Participantes	Sexo		Rango de edad (mediana), años
	F	M	
G0	12	8	23-60 (35)
G1	5	7	35-56 (45)
G2-G3	2	3	49-66 (54)
No infectados	8	9	26-59 (34)

### 2.3 Obtención de las muestras.

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) se aislaron a partir de una muestra de 40 ml de sangre mediante sistema de colección al vacío con heparina y fueron aisladas por centrifugación por gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque (Amershan/GE Healthcare, USA). Las CMSPs se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso. La muestra de suero se obtuvo a partir de una muestra de 5ml en un tubo sin anticoagulante y se guardaron a -80C° hasta su utilización.

## **2.4 Determinación de los niveles de C3a y C5a.**

Los niveles séricos de los factores C3a y C5a se determinaron mediante un ensayo de ELISA utilizando dos kits comerciales. Para la determinación de los niveles de C3a se utilizó el kit comercial “Human C3a ELISA Kit” de Invitrogen y para el de C5a se utilizó el kit comercial “LEGEND MAX Human C5a ELISA kit” de BioLegend siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Brevemente los pasos del ensayo fueron los siguientes:

Se sembraron las muestras de los pacientes y controles no infectados por duplicado y las muestras del estándar para obtener la curva de calibración en cada pocillo. Para la determinación de C3a en las muestras de los pacientes y controles se utilizó una dilución 1/400 mientras que para C5a se utilizó una dilución 1/500.

Luego de 2hrs de incubación se realizaron los lavados y se continuó con los pasos para la detección de C3a y C5a utilizando el revelado con biotina y estreptavidina-HRP. Luego de finalizada la reacción colorimétrica se procede a realizar la lectura de las muestras por absorbancia a 450nm en un lector de absorbancia (Allsheng AMR-100 microplate reader).

## **2.5 Determinación de la expresión de los receptores C3a y C5a y las moléculas regulatorias en la población de linfocitos T.**

Las muestras de CMSPs fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales específicos para las moléculas CD3 FITC anti-human , CD4 PercP anti-human , CD8 APC-Cy7 anti-human , para determinar la población de linfocitos T y los anticuerpos monoclonales específicos C3aR APC anti-human, C5aR1 Pe CD88, CD35 Brilliant violet 711, CD55 Pe-Cy7 anti-human y CD46 Brilliant violet 650 anti-human , para determinar la expresión de los receptores y de las moléculas regulatorias, durante 30 minutos a 4°C y

oscuridad. Además, las muestras fueron incubadas con el marcador de viabilidad Fixable Viability Stain 510 (FV510) según las instrucciones del comerciante. Luego fueron lavadas con PBS 3% SFB y fijadas con paraformaldehído al 1%. Se adquirieron aproximadamente 500.000 eventos por muestra en el citómetro FACSAria II (INIGEM Hospital de Clínicas, Buenos Aires, Argentina) y los datos fueron analizados con el programa FlowJo (versión 10.8.0, Tree Star Inc, USA).

## **2.6 Análisis estadísticos.**

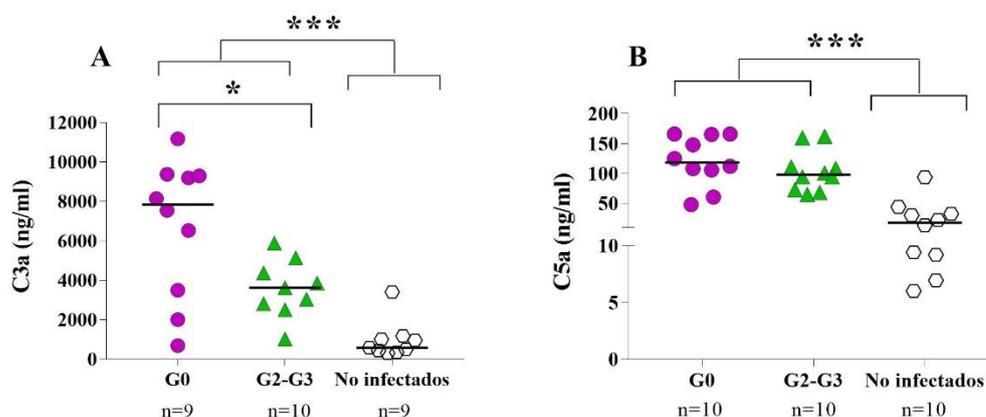
Se determinó la normalidad de la distribución de variables utilizando el criterio de Kolmogorov- Smirnov. Las diferencias entre los grupos evaluados se realizaron mediante la prueba de Mann-Whitney U o la prueba t de Student (dos colas). El análisis de los distintos marcadores entre los grupos clínicos evaluados en el trabajo se realizó utilizando el análisis de varianza (ANOVA) seguido por la corrección de Bonferroni. Para analizar las tendencias se utilizó una prueba de regresión lineal simple La correlación entre variables se realizó con la prueba de Pearson. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando los valores de P fueron  $<0.05$ .

### 3. Resultados.

#### 3.1 Niveles de C3a y C5a en sueros de pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi*.

Con el fin de evaluar los niveles de las anafilotoxinas C3a y C5a en muestras de suero de pacientes crónicamente infectados con el *T. cruzi*, se utilizaron kits comerciales. Para determinar la concentración de C3a se utilizó un kit de Invitrogen y para C5a uno de la marca Biolegend. En un primer paso fue necesario determinar la dilución de suero necesaria para poder determinar las concentraciones de las anafilotoxinas dentro del rango de detección del kit. Para ello se hizo un pequeño ensayo con sueros de un paciente G0 y un paciente G3y un control no infectado. Se probaron 3 diluciones distintas (1/400 o 1/500 1/200 y sin diluir) con el fin de determinar el rango de dilución adecuado que para el caso de C3a fue de 1/500 y para C5a 1/400 ya que las demás diluciones se iban del rango de detección del kit.

El análisis en las muestras de suero de los pacientes crónicamente infectados con el parásito mostró un incremento en los niveles de C3a y C5a comparado con los controles no infectados (Figura 1 A y B). En el caso de C3a encontramos niveles significativamente más altos en el grupo de pacientes G0 comparado con el grupo G2-G3 (Figura 1A) No se encontraron diferencias significativas entre los distintos estadios clínicos en los niveles de C5a (Figura 1B).

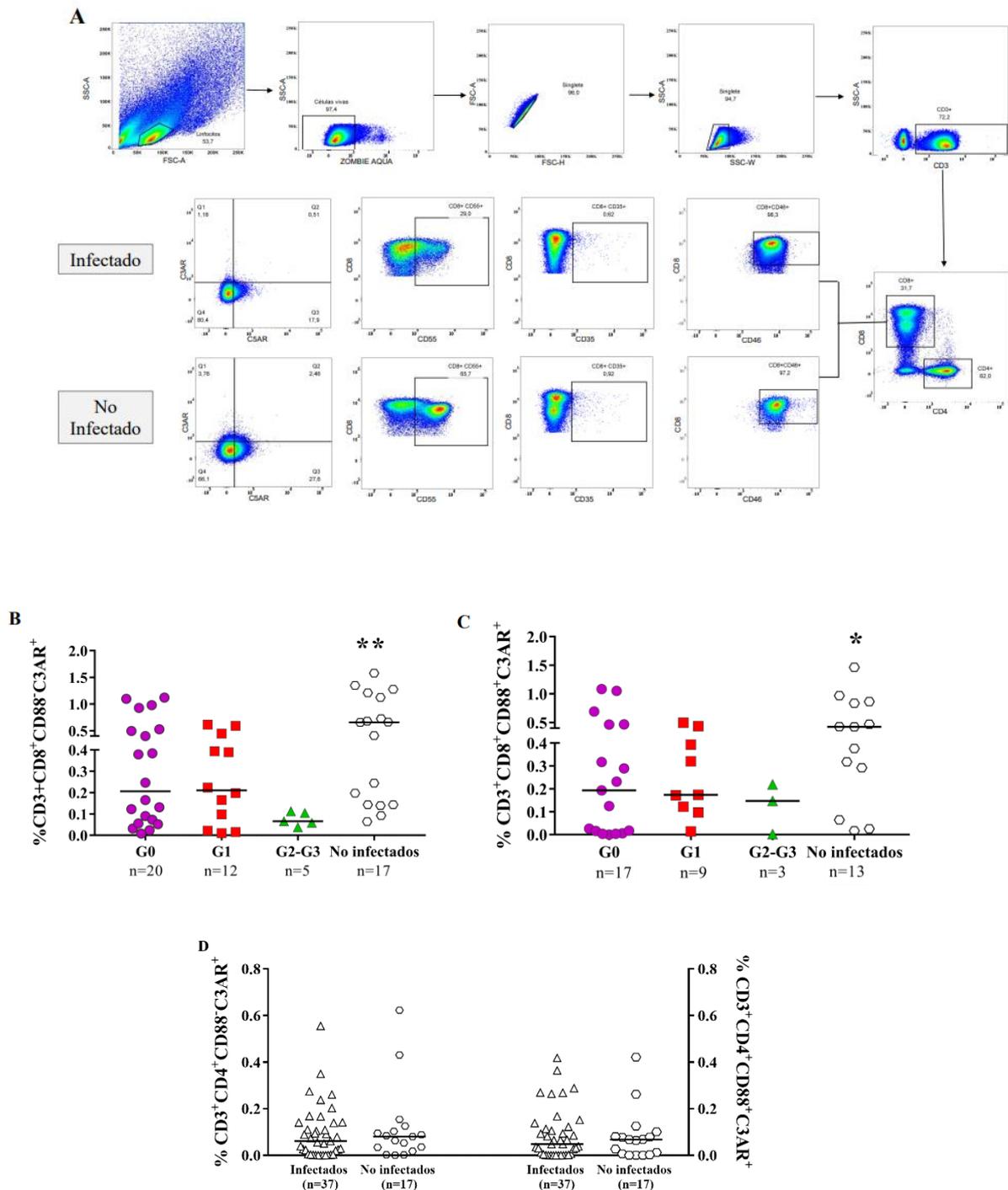


**Figura 1.** Niveles de C3a y C5a en sueros de pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi*. Se utilizaron kits comerciales para determinar la concentración de C3a (Invitrogen) y C5a (Biolegend) en las muestras de suero de pacientes y controles no infectados. Cada símbolo representa el valor obtenido para cada individuo evaluado. La línea horizontal indica el valor de la mediana. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante una prueba de Kruskal Wallis o ANOVA. \*P < 0,05 y \*\*\* P < 0,001.

### **3.2 Análisis de los receptores C3aR y C5aR en la población total de linfocitos T.**

Con el fin de determinar la expresión de los receptores de las anafilotoxinas C3a y C5a (C3aR y C5aR respectivamente) en la población total de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se utilizaron 1x10<sup>6</sup> las células mononucleares periféricas que fueron marcadas con los anticuerpos monoclonales específicos para cada molécula. La Figura 2A muestra la estrategia de selección de las poblaciones para la determinación de la expresión de los distintos marcadores evaluados en la población de linfocitos T.

Encontramos una disminución significativa de la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> con fenotipo C3aR<sup>+</sup>C5aR<sup>+</sup> y C3aR<sup>+</sup>C5aR<sup>-</sup> en pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi* (Figura 2 B-C) mientras que no se encontraron diferencias significativas en la expresión de los receptores C3aR y C5aR en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 2 D).



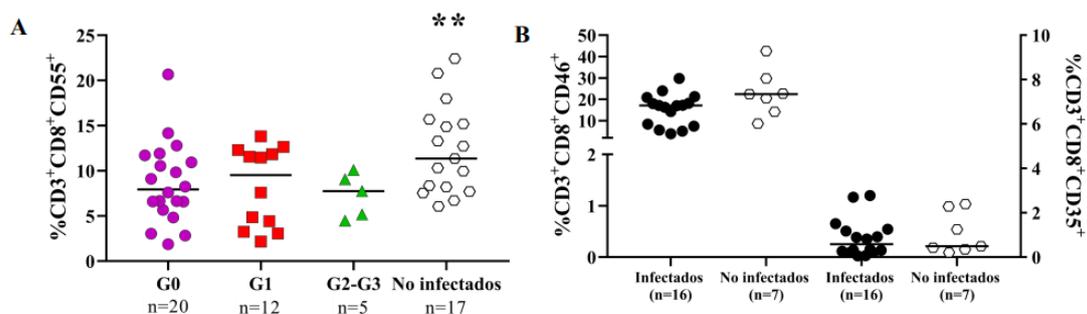
**Figura 2.** Análisis de los receptores C3aR y C5aR (CD88) en la población total de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Las células mononucleares periféricas fueron marcadas con los anticuerpos monoclonales específicos para cada molécula. Los datos fueron adquiridos en un citómetro FACSaria (Becton & Dickinson) y analizados con el

programa Flowjo versión 10. A) Estrategia de selección utilizada para determinar la expresión de las distintas moléculas evaluadas por citometría de flujo. (B-D) Frecuencia de las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> respecto al total de células CD3<sup>+</sup>. Cada símbolo representa el porcentaje de expresión de C3aR<sup>+</sup>C5aR<sup>+/-</sup> para la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (B-C) y CD4<sup>+</sup> (D) de cada individuo estudiado. La línea horizontal indica el valor de la mediana. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante una prueba de MannWhitney test. \*P < 0,05 y \*\* P < 0,01 entre los controles y los pacientes crónicamente infectados independientemente de su estadio clínico.

### 3.3 Análisis de la expresión de las moléculas regulatorias CD35, CD46 y CD55 en la población total de linfocitos T.

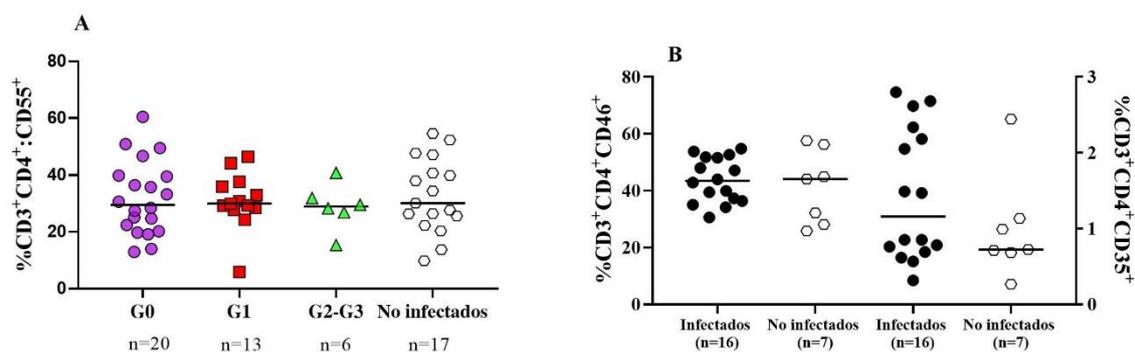
Teniendo en cuenta la importancia en la regulación del sistema del complemento para proteger a las células del daño que podría inducir una respuesta descontrolada del mismo, evaluamos la expresión de las moléculas regulatorias asociadas a la membrana CD35, CD46 y CD 55 en la población total de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

Encontramos una disminución de la expresión de la molécula regulatoria CD55 en la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi*, independientemente de la severidad de la enfermedad (Figura 3A) y no se encontraron diferencias significativas en la expresión de CD35 y CD46 en la población total de linfocitos T CD8<sup>+</sup> entre los pacientes crónicamente infectados y los controles no infectados (Figura 3B).



**Figura 3.** Análisis de la expresión de las moléculas regulatorias CD35, CD46 y CD55 en la población total de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Las células mononucleares periféricas fueron marcadas con los anticuerpos monoclonales específicos para cada molécula. Los datos fueron adquiridos en un citómetro FACS Aria (Becton & Dickinson) y analizados con el programa Flowjo versión 10. Frecuencia de la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> respecto al total de células CD3<sup>+</sup>. Cada símbolo representa el porcentaje de expresión de CD55 (A) y CD35 y CD46 (B) para la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de cada individuo estudiado. La línea horizontal indica el valor de la mediana. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante una prueba de Mann Whitney test \*\* P < 0,01 comparado con los pacientes crónicamente infectados independientemente de su estadio.

Con respecto al análisis de la expresión de los marcadores de regulación en el compartimiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, no encontramos diferencias significativas en las moléculas evaluadas entre los pacientes independientemente del estadio clínico y los controles no infectados evaluados (Figura 4 A y B).



**Figura 4.** Análisis de la expresión de las moléculas regulatorias CD35, CD46 y CD55 en la población total de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Las células mononucleares periféricas fueron marcadas con los anticuerpos monoclonales específicos para cada molécula. Los datos fueron adquiridos en un citómetro FACS Aria (Becton & Dickinson) y analizados con el programa Flowjo versión 10. Frecuencia de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> respecto al total de células CD3<sup>+</sup>. Cada símbolo representa el porcentaje de expresión de CD55 (A) y CD35 y CD46 (B) para la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de cada individuo estudiado. La línea horizontal indica el valor de la mediana. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante una prueba de Mann Whitney test \*\* P < 0,01 comparado con los pacientes crónicamente infectados independientemente de su estadio.

y CD35 y CD46 (B) para la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de cada individuo estudiado. La línea horizontal indica el valor de la mediana. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante una prueba de Mann Whitney test.

#### 4. Conclusiones

En este trabajo realizamos una caracterización de factores del sistema de complemento en muestras de pacientes con distintos estadios clínicos de la enfermedad de Chagas. Mediante la técnica de ELISA evaluamos los niveles en suero de las anafilotoxinas C3a y C5a y utilizando la técnica de citometría de flujo policromática determinamos la expresión de las distintas moléculas del sistema de complemento en la población total de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

Los mayores niveles de las anafilotoxinas, C3a y C5a, encontradas en las muestras de sueros de pacientes crónicamente infectados coinciden con lo observado en otras infecciones crónicas, tales como HIV, hepatitis B (Xu R y col., 2013 & Rossheim y col., 2016). En el caso de la anafilotoxina C3a, encontramos niveles aumentados en los pacientes en el estadio asintomático (G0) comparado con los pacientes en los estadios con mayor compromiso cardíaco (G2-G3) mientras que para C5a observamos que, independientemente del estadio clínico, los valores en suero fueron más altos que en los controles no infectados. Teniendo en cuenta que la anafilotoxina C3a puede ejercer tanto efectos pro- como anti-inflamatorios, de acuerdo al microambiente en el que se encuentren, se podría pensar que C3a en el grupo de pacientes asintomáticos podría estar cumpliendo un rol anti-inflamatorio detectable en la circulación mientras que en el grupo de pacientes con sintomatología cardíaca o bien no se detecta porque se encuentra en corazón teniendo un rol más inflamatorio relacionado con el microambiente generado por la patología en ese estadio clínico o no se produce debido al estado de agotamiento inmunológico ya demostrado en este grupo de pacientes. Es importante aclarar que no fue posible para este trabajo evaluar la expresión de estas moléculas en el grupo G1 debido a que para poder poner a punto el ensayo de ELISA se tuvo que utilizar parte del kit. Será importante completar este ensayo con más pacientes y con el grupo G1 a fin de tener una caracterización completa de estas moléculas.

Los pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi*, independientemente del grado de severidad de la enfermedad, presentaron alteraciones en la expresión de los receptores C3aR y C5aR, así como también en la molécula reguladora CD55 en la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> mientras que no lo observamos en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

La estimulación persistente del parásito estaría impactando de forma diferencial en la población de linfocitos T, siendo la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> la que demuestra el impacto. Podría pensarse que dado que es un parásito intracelular, la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> se encuentra más afectada, activando los receptores y por lo tanto disminuyendo su expresión y reflejándose en la circulación. Además, esta mayor activación estaría acompañada por la actividad regulatoria de la molécula CD55, también reflejada en los menores niveles de expresión. Con respecto a las moléculas regulatorias CD35 y CD49, que no mostraron alteraciones en el compartimiento total de los linfocitos T cabe aclarar que el grupo de pacientes en los que se evaluó su expresión fue menor comparado con el grupo dónde se evaluó la molécula CD55. Esta diferencia se debió a que los anticuerpos para determinar la expresión de CD35 y CD46 una gran demora en llegar y no pudieron evaluarse en la totalidad de las muestras. Por lo tanto, es importante incorporar un mayor número de pacientes para poder hacer una correcta evaluación de estos marcadores.

Varios estudios han mostrado que la excesiva activación del complemento produce elevadas concentraciones en plasma del factor C5a y un aumento de la expresión de su receptor, C5aR, en el miocardio de corazones de individuos con falla cardíaca y se lo ha asociado con enfermedades cardiovasculares (Amsterdam EA y col & Oksjoki R y col). También se observó una correlación entre la expresión de receptores de las anafilatoxinas (C3aR y C5aR) y marcadores de activación en plaquetas (P-selectina) en pacientes que padecen enfermedad coronaria (Patzelt J y col) y elevadas concentraciones de C5a en plasma se correlacionaron positivamente con la gravedad de pacientes infectados con hepatitis B (Xu R y col).

Teniendo en cuenta el rol de las moléculas de complemento en la modulación de la respuesta celular T estos resultados podrían sugerir su participación en el proceso de agotamiento observado en el sistema inmune de los pacientes crónicamente infectados con el parásito.

Comprender la interacción entre el complemento y la respuesta inmune adaptativa es importante en el contexto de enfermedades con una patogénesis inflamatoria. Estas interacciones podrían contribuir a la patofisiología de la enfermedad de Chagas

contribuyendo en el proceso inflamatorio asociado con el desarrollo de la miocarditis característico de la enfermedad de Chagas.

Además, una mejor comprensión de los mecanismos homeostáticos involucrados en la enfermedad de Chagas y el desarrollo de las lesiones cardíacas, podrían ser importantes para el desarrollo de marcadores de progresión y de posibles nuevas estrategias preventivas y terapéuticas para la enfermedad.

## Bibliografía.

- Addis-Lieser E y col. Opposing regulatory roles of complement factor 5 in the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J. Immunol.* 2005; 189
- Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suarez JA, Abate T, Naranjo L, Paiva M, Rivas L, Castro J, Márques J, Mendoza I, Acquatella H, Torres J, Noya O. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis.* 2010; 201:1308-1315.
- Albareda MC y col. Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4+ T cells to immune senescence. *J Immunol* 2009; 183(6): 4103-8.
- Albareda MC y col. Distinct Treatment Outcomes of Antiparasitic Therapy in *Trypanosoma cruzi* -Infected Children Is Associated With Early Changes in Cytokines, Chemokines, and T-Cell Phenotypes", *Frontiers Immunol* 2018 Sep 13;9:1958.
- Albareda MC y col. Perturbed T cell IL-7 receptor signaling in chronic Chagas disease. *J Immunol* 2015; 194(8): 3883-9.
- Albareda MC y col. Polyfunctional T cell responses in children in early stages of chronic *T. cruzi* infection contrast with monofunctional responses of long-term infected adults. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7: e2575.
- Albareda MC y col. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol* 2006; 18: 465–471.
- Albareda MC y col. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol* 2006; 18: 465–471.
- Alvarez MG y col. HLA class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8+ T cells in chronic Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2:e288.
- Amsterdam EA y col. Limitation of reperfusion injury by a monoclonal antibody to C5a during myocardial infarction in pigs. *Am J Physiol.* 1995; 268:H448

- Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M. Enhancement of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. Am J Pathol. 1987; 127:467-473.
- Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Wenthold RJ Jr, Hilbert SL, Ferrans VJ. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. Am J Trop Med Hyg. 1997; 57:328-336.
- Arbore G y col. Intracellular complement - the complosome - in immune cell regulation. Mol Immunol. 2017; 89:9.
- Bacal F, Silva CP, Bocchi EA, Pires PV, Moreira LF, Issa VS, Moreira SA, das Dores Cruz F, Strabelli T, Stolf NA, Ramires JA. Mychophenolate mofetil increased chagas disease reactivation in heart transplanted patients: comparison between two different protocols. Am J Transplant. 2005; 5(8):2017-21.
- Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. Nat Immunol. 2002; 3(7):619-26.
- Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. Nat Immunol. 2004; 5(8):809-17.
- Benoist, C. and Mathis, D. (2001) Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? Nat. Immunol. 2, 797–801.
- Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Dantas RO, Maguire JH, Acquatella H, Morillo C, Kirchhoff LV, Gilman RH, Reyes PA, Salvatella R, Moore AC. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. JAMA. 2007; 298(18):2171-2181.
- Benvenuti LA, Rogério A, Nishiya AS, Campos SV, Fiorelli AI, Levi JE. *Trypanosoma cruzi* persistence in the native heart is associated with high-grade myocarditis, but not with Chagas' disease reactivation after heart transplantation. J Heart Lung Transplant. 2014; 33(7):698-703
- Bittencourt AL, Sadigursky M, Barbosa HS. Congenital Chagas' disease. Study of 29 cases (en portugués). Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1975; 17:146-159.

- Borda ES, Pascual J, Cossio P, Vega M, Arana R, Sterin-Borda, L. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to  $\beta$ -adrenoreceptors of myocardium and modulates their activity. *Clin Exp Immunol*. 1984; 57:679-686.
- Braga, M.S. et al. (2000) Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 42, 157–161.
- Burkholder JE, Allison TC, Kelly VP. *Trypanosoma cruzi* (Chagas) (Protozoa: Kinetoplastida) in invertebrate, reservoir and human hosts of the lower Rio grande Valley of Texas. *J Parasitol*. 1980; 66:305-311.
- Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol*. 2006; 25:471-479.
- Centers For Disease Control and Prevention <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.
- Cerisola JA, Rohweder R, Segura EL, del Prado CCe, Alvarez M, de Martini GJW. El xenodiagnóstico: Normalización, utilidad. Premio Geigy. 1974. Publicación del Ministerio de Bienestar Social. Secretaría de Estado de Salud Pública. Buenos Aires. 1974.
- Clarke EV, TennerAJ. Complement modulation of Tcell immune responses during homeostasis and disease. *J Leukoc Biol*. 2014;96(5):745-56.
- Coura, J.R. and de Castro, S.L. (2002) A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 3–24.
- Coulthard LG y Woodruff TM. Is the complement activation product C3a a proinflammatory molecule? Reevaluating the evidence and the myth. *J Immunol*. 2015; 194:354.
- Dias JC. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop* 1989;22: 147–56.
- Dutra WO y col. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int Immunol* 1994.
- Dutra WO y col. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int Immunol* 1994; 6: 499.

- Dutra WO y col. 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 1:208-18.
- Dutra WO y col. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol*. 2014;36:377-87.
- Engman, D.M. and Leon, J.S. (2002) Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Trop*. 81, 123–132.
- Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987; 81:755-759.
- Girones, N. and Fresno, M. (2003) Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol*. 19, 19–22.
- Gold MC y col. MR1-restricted MAIT cells display ligand discrimination and pathogen selectivity through distinct T cell receptor usage. *J Exp Med* 2014; 211:1601–1610.
- Hajishengallis G y Lambris JD. More than complementing Tolls: complement-Toll-like receptor synergy and crosstalk in innate immunity and inflammation. *Immunol Rev*. 2016; 274:233.
- Hovingh ES y col. Complement Regulatory Proteins for Bacterial Immune Evasion. *Front Microbiol*. 2016; 7:2004
- Jones, E.M. et al. (1993) Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 48, 348–35.
- Karsten MC y col. Monitoring and cell-specific deletion of C5aR1 using a novel floxed GFP-C5aR1 reporter knock-in mouse, *J. Immunol*. 2015; 194: 1841.
- Kim DD y Song W-C. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol Orlando Fla*. (2006) 118:127–36.
- Koberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol*. 1968; 6:63-116.
- Klos A y col The role of the anaphylatoxins in health and disease 2009; 46:2753.

- Kuschnir E y col 1985 ; Criteria Committe of the New York Heart Association.
- Kuschnir E, y col. Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy. Arq Bras Cardiol 1985.
- Laranja FS, Dias E, Dobrega G, Miranda A. Chagas`s diseases. A clinical, epidemiologic and pathologic study. Circulation. 1956; 14:1035-1060.
- Laucella AS y col. Soluble cell adhesion molecules in human Chagas' disease: association with disease severity and stage of infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1996; 55:629-34
- Laucella SA y col. Changes in *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy. Clin Infect Dis. 2009; 49: 1675.
- Laucella SA y col. Frequency of interferon-gamma-producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. J Infect Dis 2004; 189: 909–918.
- Laucella SA y col. Soluble platelet selectin (sP-selectin) and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) decrease during therapy with benznidazole in children with indeterminate form of Chagas' disease. Clin Exp Immunol 1999
- Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. Lancet Infect Dis 2013;13:342–8.
- Liszewski MK y col. Complement's hidden arsenal: New insights and novel functions inside the cell. Mol Immunol. 2017; 84:2
- Losavio A, Jones MC, Sanz OP, Mirkin G, Gonzalez Cappa SM, Muchnik S, Sica REP. A sequential study of the peripheral nervous system involvement in experimental Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg. 1989; 41:539-47.
- Maya JD, Repetto Y, Agosin M, Ojeda JM, Tellez R, Gaule C, Morello A. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1997; 86:101-106.
- Maya JD, Bollo S, Núñez-Vergara LJ, Squella JA, Repetto Y, Morello A, Perie J, Chauviere G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurant derivatives. Biochem Pharmacol. 2003; 65:999-1006.

- Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faundez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007; 146:601-620.
- Mazza S. Tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Prens. Med. Arg* 1941 28, 1579.
- Mitelman JE. Consenso de Enfermedad de Chagas-Mazza. Sociedad Argentina de Cardiología. *Rev Argent Cardiol.* 2011; 79:544-64.
- Mishra N y col. Altered Expression of Complement Regulatory Proteins CD35, CD46, CD55, and CD59 on Leukocyte Subsets in Individuals Suffering From Coronary Artery Disease. *Front Immunol.* Aug 29;10:2072.
- Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive D, Zajac A, Ahmed R. In vivo dynamics of anti-viral CD8 T cell responses to different epitopes. An evaluation of bystander activation in primary and secondary responses to viral infection. *Adv Exp Med Biol.* 1998; 452:123-42.
- Oliveira Almeida H, Antunes Teixeira VP, Gobbi H, Rocha A, Costa Brandao M de. Inflamacao associada a celulas musculares cardiacas parasitadas pelo T. cruzi, em chagasicos cronicos. *Arq Bras cardiol.* 1984. 42/3:183-186.
- Oksjoki R y col. Receptors for the anaphylatoxins C3a and C5a are expressed in human atherosclerotic coronary plaques. *Atherosclerosis.* 2007;195:90.
- Palomino, S.A. et al. (2000) Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94, 571–579.
- Patzelt J y col Expression of anaphylatoxin receptors on platelets in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2015; 238.
- Pinto AY, Valente SA, Valente VDC, Ferreira Junior AG, Coura JR. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005 (en portugués). *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41:602-614.
- Piron M, Vergés M, Muñoz J, Casamitjana N, Sanz S, Maymó RM, Hernández JM, Puig L, Portús M, Gascón J, Sauleda S. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi*

- infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *Transfusion*. 2008; 48(9):1862-1868.
- Postan M, Dvorak J.A & McDaniel J.P. Studies on *T. cruzi* clones in inb/HeN mice with two clones isolated from a common source. *Am J Trop Med Hyg*. 1983 32:497-506.
  - Postan M, Baily JJ, Dvorak JA, McDaniel JP , Pottala EW. Studies of *T. cruzi* clones in inbred mice. III. Histopathological and electrocardiographical responses to chronic infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1987 37: 541-9.
  - Programa Nacional de Garantía de la Atención Médica del Ministerio de Salud para la atención del paciente infectado con *T. cruzi* , Resolución 1870/2006 Ministerio de Salud de la Nación Argentina.
  - Rassi A, Clínica : Fase Aguda. En *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas* (Z. Brener& Z. Andrade, Eds) Guanabara Koogan , Rio de Janeiro, Brasil , 1979.
  - Ribeiro AL, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MO. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*.
  - Addis-Lieser E y col. Opposing regulatory roles of complement factor 5 in the development of bleomycininduced pulmonary fibrosis. *J. Immunol*. 2005; 189
  - Ricklin D y col. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010; 11:785
  - Rosenbaum MB. Chagasic myocardopathy. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 1964; 7:199-225.
  - Rossheim A y col Effects of Well-Controlled HIV Infection on Complement Activation and Function *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016; 73(1): 20.
  - Rossi MA y col. Experimental *T. cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice: histochemical evidence of hypoxic changes in the myocardium. *Br J Exp Pathol*, 1985.
  - Santos-Buch CA, Acosta A. Pathology of Chagas' disease. En: *Immunology and pathogenesis of Trypanosomiasis*. Editor: Ian Tizard. Boca Raton, Florida. Ed. CRC Press, Inc. 1985.

- Sandri TL y col. Human complement receptor type 1 (CR1) protein levels and genetic variants in chronic Chagas Disease. *Sci Rep.* 2018 11;8(1):526
- Schijman AG, Vigliano CA, Viotti RJ, Burgos JM, Brandariz S, Lococo BE, Leze MI, Armenti HA, Levin MJ. Trypanosoma cruzi DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic Chagas heart disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 70(2):210-220.
- Semple JW y col. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):264-74
- Sica RE, Filipini D, Panizza M, Fumo T, Baso S, Lazzari J, Molina HA. Involvement of the peripheral sensory nervous system in human chronic Chagas disease. *Medicina.* 1986; 46:662-668.
- Soares, M.B. et al. (2001) The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73, 547–559.
- Sosa Estani S, Segura EL. Treatment of Trypanosoma cruzi infection in the indeterminate phase: experience and current guidelines in Argentina. *Medicina (B Aires).* 1999; 2:166-170.
- Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis.* 2012; 54:845-852.
- Speidl WS y col. Complement component C5a predicts future cardiovascular events in patients with advanced atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2005; 26:2294
- Strey, CW y col. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J. Exp. Med.* 2003; 198, 913.
- Strout RG. A method for concentrating hemoflagellates. *J Parasitol.* 1962; 48:100
- Strutt TM y col. Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen. *Nat Med* 2010; 16(5): 558-64.
- Sun JC y col. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 2009;457:557–561.
- Tarleton, R.L. et al. (1997) Autoimmune rejection of neonatal heart transplants in experimental Chagas' disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3932–3937.

- Tarleton RL, Zhang L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today*. 1999; 15:94-99.
- Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol*. 2001; 31(5-6):550-554.
- Tarleton RL. Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol* 2003; 19(10): 447-51.
- TDR/WHO, 2012. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. WHO Technical Report Series, no. 975.
- Urbina JA. Specific Chemotherapy of Chagas Disease: Relevance, Current Limitations and New Approaches. *Acta Trop*. 2010; 115(1-2):55-68.
- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*. 2000; 156:1805-1809.
- Vago, A.R. et al. (1996) PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet* 348, 891–892.
- Viotti R y col. Impact of aetiological treatment on conventional and multiplex serology in chronic Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2011
- Viotti, R. et al. (1994) Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with longterm follow-up. *Am. Heart J*. 127, 151–162.
- Viotti R y col. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Annals of Internal Medicine* 2006; 144:724.
- Vivier E y col. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011;331:44–49.
- Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*. (2001) 344:1058–66.
- Wegner DH, Rohwedder RW. The effect of nifurtimox in acute Chagas' infection. *Arzneimittelforschung*. 1972; 22:1624-1635

- World Health Organization. Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep Ser 2021.
- Xu R y col. Complement 5a stimulates hepatic stellate cells in vitro, and is increased in the plasma of patients with chronic hepatitis B. *Immunology*. 2013; 138:228.
- Zeledón R. Los vectores de la enfermedad de Chagas en America. Simposio Internacional. Enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Argentina 1972 327-345
- Zhang, L. and Tarleton, R.L. (1999) Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J. Infect. Dis.* 180, 480–486.