



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Tesis de doctorado en Ciencias Químicas

**Estudio de los mecanismos protectores mediados por citoquinas de  
la familia de interleuquina 17 durante la infección con  
*Trypanosoma cruzi***

Jimena Tosello Boari

Directora de tesis: Dra. Eva Acosta Rodriguez

Comisión de tesis: Dra. Cristina Motrán,  
Dr. Gabriel Cuadra y Dr. Fernando Irazoqui

Córdoba-Argentina, 2015

## ÍNDICE

<b>Introducción</b> .....	<b>2</b>
• La enfermedad de Chagas.....	<b>2</b>
Un problema complejo.....	<b>2</b>
La situación en Argentina.....	<b>4</b>
Aproximación a la dimensión biomédica.....	<b>5</b>
La respuesta inmune frente a <i>T. cruzi</i> .....	<b>9</b>
• Las citoquinas de la familia IL-17.....	<b>20</b>
IL-17A, IL-17F e IL-17A/F.....	<b>22</b>
IL-17E.....	<b>28</b>
IL-17C.....	<b>29</b>
IL-17B e IL-17D.....	<b>30</b>
Rol de las IL-17s en infecciones.....	<b>30</b>
• Antecedentes del grupo de trabajo.....	<b>34</b>
<b>Objetivos e hipótesis de trabajo</b> .....	<b>37</b>
<b>Resultados I</b> .....	<b>41</b>
• Las citoquinas IL-17A, IL-17E e IL-17F se producen en respuesta a la infección con <i>T. cruzi</i> . .....	<b>41</b>
• La señalización vía IL-17RA participa en el control del parasitismo tisular en la infección con <i>T. cruzi</i> .....	<b>43</b>
• La susceptibilidad de los ratones IL-17RA KO a la infección con <i>T. cruzi</i> correlaciona con mayor daño hepático .....	<b>45</b>
• La susceptibilidad de los ratones IL-17RA KO a la infección con <i>T. cruzi</i> es consecuencia de una incrementada inflamación .....	<b>48</b>
• Conclusiones.....	<b>51</b>
<b>Resultados II</b> .....	<b>55</b>
• La expresión de IL-17RA regula el número de neutrófilos en tejidos durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	<b>55</b>

• La señalización a través de IL-17RA participa en el reclutamiento de neutrófilos a tejidos durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	58
• La infección con <i>T. cruzi</i> promueve la diferenciación de neutrófilos supresores productores de IL-10.....	62
• Los neutrófilos regulan in vivo la producción de IFN- $\gamma$ y el daño hepático durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	64
• Conclusiones.....	69
<b>Resultados III.....</b>	<b>72</b>
• La señalización a través de IL-17RA influencia críticamente la magnitud de la respuesta de linfocitos T CD8+ específicos en la infección con <i>T. cruzi</i> .....	72
• IL-17RA promueve el mantenimiento de los linfocitos T CD8+ activados durante la infección con <i>T. cruzi</i> a través de un mecanismo de señalización intrínseco.....	77
• La señalización a través de IL-17RA durante la infección con <i>T. cruzi</i> sostiene la supervivencia de los linfocitos T CD8+ totales y específicos.....	81
• Las citoquinas de la familia IL-17 influyen en la activación y diferenciación de los linfocitos T CD8+ durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	85
• La señalización a través de IL-17RA durante la infección con <i>T. cruzi</i> previene el agotamiento de los linfocitos T CD8+.....	87
• La expresión de IL-17RA regula el programa transcripcional de los linfocitos T CD8+ activados durante la infección por <i>T. cruzi</i> .....	92
• IL-17A y/o IL-17F modulan la activación, previenen el agotamiento temprano e incrementan la magnitud de la respuesta de linfocitos T CD8+ específicos en la infección con <i>T. cruzi</i> .....	95
• La expresión de IL-17RA en los linfocitos T CD8+ les confiere mayor capacidad protectora durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	97
• Conclusiones.....	98
<b>Discusión.....</b>	<b>101</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>120</b>



## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

Act-1: del inglés, *nuclear factor kB activator 1*.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ANOVA: Análisis de la varianza.

BATF: del inglés, *basic leucine zipper transcription factor, ATF-like*.

Bcl-6: proteína 6 del linfoma de células B.

BCR: receptor de la célula B.

Blimp-1: del inglés, *B lymphocyte-induced maturation protein-1*.

C/EBP: del inglés, *CCAAT-enhancer-binding proteins*.

CBA: del inglés, *cytometric bead array*.

CCL: del inglés, *C-C motif ligand*

CD: del inglés, *cluster of differentiation*.

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad.

Col.: Colaboradores.

CPA: células presentadoras de antígenos.

CTLA-4: del inglés, *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*.

CXCL: del inglés, *C-X-C motif ligand*.

DTU: del inglés, *Discrete Typing Units*.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

ELISA: enzimoimmunoanálisis, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

Eomes: Eomesodermin.

FT(s): factor(es) de transcripción.

G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos.

GATA-3: del inglés, *Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3*.

GPI: anclaje glicofosfatidilinositol.

GPII: glicofosfatidilinositol libre de anclaje.

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

h: Hora/s

ICAM-1: del inglés, *Intercellular Adhesion Molecule 1*.

Id: del inglés, *Inhibitor of DNA-binding*.

IFM: Intensidad de Fluorescencia Media.

IFN ( $\gamma$ ): Interferón (gamma).

Ig (G, M): inmunoglobulina (G, M).

IDO: del inglés, indoleamina dioxigenasa.

IL-: Interleuquina.

IL-17R: Receptor de IL-17

IL-17RA KO: ratones deficientes en IL-17RA.

iNOS: enzima óxido nítrico sintetasa inducible, del inglés inducible nitric oxide synthase.

IRF4: del inglés, *Interferon regulatory factor 4*.

KLRG-1: del inglés, *killer cell lectin-like receptor G1*.

KO: del inglés, *knock-out*.

LAG-3: del inglés, *lymphocyte activation gene-3*.

LCMV: Virus de la coriomeningitis linfocítica.

LiT: Linfocito T.

Linfocitos Th: Linfocito T CD4+ cooperador.

Linfocitos Treg: Linfocito T CD4+ regulatorio.

MAPK: del inglés, *Mitogen-activated protein kinases*.

min: minutos

MMP: metaloproteinasas.

MyD88: del inglés, *Myeloid differentiation primary response gene 88*.

NF-KB: del inglés, *Nuclear factor kB*.

NK: células o linfocitos *Natural Killer*.

NKT: células o linfocitos T tipo NK.

NLR: receptores tipo NOD.

NO: óxido nítrico.

PAMPs: moléculas altamente conservadas en microorganismos patogénicos, del inglés *Pathogen associated molecular pattern*.

PBS: Buffer fosfato salino.

PD-1: *del inglés, programmed cell death-1*.

PGE-2: Prostaglandina E-2.

pi: Post-infección

PRR(s): receptor(es) de reconocimientos de patrones, del inglés *Pattern recognition receptor(s)*.

RANKL: del inglés, *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*.

RLR: receptores tipo RIG.

ROR $\gamma$ T: del inglés, *Retinoic acid-related orphan receptor gT*.

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

STAT: del inglés, *Signal transducer and activator of transcription*.

T-bet: del inglés, *T-box transcription factor TBX21*.

TBX21: del inglés, *T-box transcription factor*

TCF7: del inglés, *transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)*.

TCR: Receptor de la célula T.

TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante beta.

Tim-3: del inglés, *T-cell immunoglobulin domain 3*.

TLR: receptores tipo *Toll*, del inglés *Toll like receptor*.

TNF: factor de necrosis tumoral, del inglés *Tumoral necrosis factor*.

TRAF: del inglés, *TNF receptor associated factor*.

Treg: Células T regulatorias.

TRIF: del inglés, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* .

VCAM-1: del inglés, *Vascular cell adhesion protein 1*.

WT: ratones C57BL/6.

## RESÚMEN

La tripanosomiasis americana es una zoonosis, de transmisión vectorial, transmitida por un protozooario intracelular flagelado llamado *Trypanosoma cruzi*. La fisiopatología de la enfermedad es compleja y hasta el momento no ha sido completamente dilucida; sin embargo se sostiene que tanto el parásito como la respuesta inmune que el hospedador monta frente al mismo, podrían estar involucrados. Teniendo en cuenta que la respuesta inmune participa tanto en el control del parásito como en la patología asociada a la infección con *T. cruzi* y, que la misma puede ser blanco de eventuales estrategias de intervención como vacunas o nuevas terapias, es clave profundizar su conocimiento. Recientemente se ha demostrado que citoquinas de la familia IL-17 contribuyen en la defensa del huésped frente a muchos patógenos intracelulares. De manera similar a lo que ocurre con microorganismos extracelulares, las funciones de protección adscriptas a IL-17 en infecciones intracelulares se circunscriben a la inducción de inflamación y el reclutamiento de células de la inmunidad innata, y sólo eventualmente se vinculan con mecanismos de la inmunidad adaptativa. La hipótesis que guía este trabajo sostiene que IL-17RA y las citoquinas que por él señalizan cumplen funciones protectoras en la infección con *T. cruzi*, asociadas a la modulación de la inmunidad innata, la inflamación y la respuesta inmune adaptativa antiparasitaria. A lo largo de esta tesis describió que las citoquinas de la familia de IL-17 que señalizan por IL-17RA juegan un papel protector clave durante la infección intracelular con el parásito *T. cruzi*. Las investigaciones aquí realizadas respecto de los mecanismos protectores involucrados, indican que los efectos protectores de las citoquinas IL-17 dependen tanto de la modulación de la respuesta inmune innata como de la adaptativa. En este sentido, las citoquinas IL-17 favorecen el reclutamiento de neutrófilos que, en el contexto de la infección con *T. cruzi*, adoptan un perfil regulatorio dependiente de la producción de IL-10 y colaboran así con la regulación de la inflamación. Por otro lado, las mismas citoquinas actúan de forma directa sobre los Lin<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> regulando su supervivencia, activación y agotamiento y potenciando una respuesta citotóxica robusta que favorece el control del parásito en tejidos. Los hallazgos de esta tesis colaboran a la comprensión de las respuestas inmunes regulatoria y citotóxica durante la infección con *T. cruzi* y aportan conocimiento básico sobre la capacidad regulatoria de los neutrófilos y el desarrollo de respuestas citotóxicas. Esta información tiene potencial impacto en distintos contextos como otras infecciones, cáncer, autoinmunidad e inmunoterapia.

# INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas

Un problema complejo  
La situación en Argentina  
Aproximación a la dimensión biomédica  
La respuesta inmune frente a *T. cruzi*

Las citoquinas de la familia IL-17

IL-17A, IL-17F e IL-17A/F  
IL-17E  
IL-17C  
IL-17B e IL-17D  
Rol de las IL-17s en infecciones

Antecedentes del grupo de trabajo

## La enfermedad de Chagas

### Un problema complejo

La tripanosomiasis americana, conocida comúnmente como el mal de Chagas, es una zoonosis, de transmisión vectorial, considerada una de las principales enfermedades parasitarias del mundo [1]. A principios de 2015, la Organización Mundial de la Salud estimó que la población infectada alcanza los 7 millones de personas, mientras la que vive en situación de riesgo de infección llega a los 25 millones, y mueren 10.000 personas al año [2]. Estas cifras, junto al estrecho vínculo que existe entre esta dolencia y el escaso desarrollo social y económico de los países que la albergan, convierten a la Enfermedad de Chagas en un problema de salud pública crítico en toda Latinoamérica [3].

Según Sanmartino y colaboradores (col.) [3-5], la enfermedad de Chagas es una problemática compleja de salud socio-ambiental, definida y caracterizada por un conjunto de dimensiones interrelacionadas: biomédica, epidemiológica, política, y sociocultural. Si bien esta tesis doctoral indaga un objeto de estudio sumamente específico y propio de la dimensión biomédica, se propone aquí situarlo en la multiplicidad de factores involucrados, para así contextualizar sus resultados, y ejercitar una actitud crítica respecto de los conocimientos en ella producidos [6, 7].

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es un protozooario intracelular flagelado llamado *Trypanosoma cruzi* que infecta a mamíferos de más de 100 especies, entre ellos al hombre [8]. La vía de contagio epidemiológicamente más importante es la vectorial e involucra a insectos hematófagos que pertenecen a la familia Reduviidae.

Si bien hay muchas especies de estos triatomos que se infectan con *T. cruzi*, las más relevantes son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus*, especies que colonizan las viviendas humanas y se expanden en el continente americano desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina (revisado por



**Figura 1. La enfermedad de Chagas: un problema a escala global.** Rutas de migración desde América latina y distribución mundial de casos de la enfermedad de Chagas. Adaptado de Coura y Vinas [13].

Coura y col. [9, 10]). Existen también otros mecanismos a través de los cuales una persona puede contraer el parásito: de manera congénita, a través de transfusiones sanguíneas, por el consumo de bebidas o alimentos contaminados con heces de triatominos, entre otros menos frecuentes [1]. En conjunto, se estima que ocurren 28.000 nuevos casos al año [2]. La infección con *T. cruzi* tiene amplia prevalencia en América Latina, donde es endémica en 21 países, incluida la Argentina [2]. Sin embargo, dinamizada por el intenso movimiento migratorio característico de los últimos años y sus formas de transmisión no vectorial, esta enfermedad ha expandido sus límites hacia zonas no endémicas y se constituye como un problema de salud a escala global (figura 1) [2, 11-13].

Al contraer la infección con *T. cruzi* la mayoría de las personas desarrolla una etapa aguda asintomática, transita luego a una fase indeterminada sin patología manifiesta y, en alrededor del 30% de los casos, evoluciona a su forma crónica característica, que cursa con alteraciones cardíacas o digestivas [14, 15]. Se estima que como consecuencia de la patología crónica cerca de 12.000 personas mueren cada año y muchos otros sufren algún tipo de discapacidad física que requiere costosos tratamientos específicos [2]. Además de la pérdida irreparable de vidas, la enfermedad de Chagas ocasiona perjuicios económicos a nivel personal y regional. Se calcula que el costo anual de esta enfermedad es de 7 millones de dólares, cifra que alcanza la carga económica mundial de muchos tipos de cáncer e infecciones de reconocida incidencia global [16]. Asimismo, gastos adicionales de esta dolencia se derivan de la atención médica relacionada a ella y de los tratamientos quimioterapéuticos que requiere [2]. La alta carga económica de la enfermedad desborda las economías de los países endémicos en vías de desarrollo y retroalimenta el circuito entre enfermedad y pobreza [17]. La gravedad de la situación ha sido reconocida, en modo explícito o implícito, por distintas esferas de la sociedad, al punto que el tema fue objeto de diferentes planes de política sanitaria y científica [11, 18, 19]. A nivel de las iniciativas locales, numerosas políticas de control vectorial, educación y salud fueron implementadas en los países más afectados y (en algunos aspectos) se han integrado recientemente en iniciativas regionales [18]. A nivel internacional, la Organización Mundial de la Salud y otras autoridades de salud pública reconocieron al Chagas como una enfermedad tropical desatendida y emprendieron programas para combatirla [19-21]. A pesar de ello y en contexto, garantizar el derecho a la salud respecto de esta dolencia, sigue siendo una tarea pendiente [22].

Sumado a los distintos inconvenientes de salud que se desprenden directamente de la enfermedad, las personas con Chagas atraviesan problemas derivados de las representaciones sociales que sobre ellos se construye [5, 23]. Este conjunto de estigmatizaciones y prejuicios tienen como correlato la discriminación y marginalización de las personas enfermas. Subvertir estas prácticas cotidianas implica construir nuevos discursos que dimensionen al Chagas como un problema que involucra a la sociedad en su conjunto [5].

### Situación en Argentina

Se estima que en Argentina hay 1.600.000 personas infectadas (el 4% de la población), 2.300.000 expuestas, y más de 370.000 afectadas por cardiopatías de origen chagásico. Se calcula que al año ocurren cerca de 1.100 nuevos contagios por vía vectorial y 1.500 nacimientos de niños infectados afectados por la transmisión congénita [24]. Estas estadísticas señalan a la Argentina como el país con más infectados en todo Latinoamérica, y a la transmisión congénita como la vía de contagio de mayor relevancia.

El área de extensión de esta dolencia abarca todas las provincias con una tasa de infestación<sup>a</sup> heterogénea, en estrecha relación a la presencia del vector *Triatoma infestans*. Al respecto, el Programa Nacional de Chagas definió distintas situaciones en cuanto al riesgo vectorial y declaró el riesgo de transmisión congénita en las 24 jurisdicciones del país [25]. Particularmente, el área conocida como el Gran Chaco Americano (que abarca 13 provincias del noroeste y centro de la Argentina y a los países de Bolivia y Paraguay), es la más comprometida [18, 19, 26].

Las medidas en política sanitaria adoptadas desde 1950 en la Argentina, incluyeron la creación de instituciones destinadas a llevar adelante tareas de control, medición y atención de la enfermedad (como el Instituto Nacional de Parasitología Fátala Chabén y el Instituto Nacional de Chagas, entre otros), así como el desarrollo de programas específicos de apoyo a la investigación científica sobre el tema [3, 25]. En este marco, se pusieron en marcha controles entomológicos que lograron reducir la tasa de infestación domiciliaria y llevaron a la interrupción de la transmisión vectorial en algunas provincias (así como en Uruguay, Chile y algunos estados de Brasil) [18, 25]. Sin embargo, estos controles se enfrentan a nuevos desafíos como son: sostener la sistematicidad en su implementación, y

---

<sup>a</sup> Infestación es la invasión de un organismo vivo por parásitos. Las tasas de infestación para Chagas se calculan teniendo en cuenta el porcentaje de viviendas que alojan a personas infestadas respecto del total de viviendas analizadas.

atender la resistencia a piretroides que han desarrollado los vectores. Mientras tanto las acciones de control no vectorial se contemplan en la ley 26.281, la cual prescribe la realización y la notificación de las pruebas diagnósticas en toda mujer embarazada, los recién nacidos e hijos de madres infectadas, y donantes y receptores de órganos, tejidos y de sangre a transfundir (Ley Nacional de Chagas 26.281, sancionada en 2007).

### Aproximación a la dimensión biomédica

#### *Un poco de historia*

La historia natural de la enfermedad comenzó hace miles de años en América y desde entonces el *T. cruzi*, su vector y el ser humano han evolucionado juntos. Al respecto, el hallazgo de ADN de *T. cruzi* en momias de más de 9.000 años de antigüedad da cuenta de la ancestral relación del parásito con la especie humana [27]. Más aún, se estima que el primer contacto del parásito con los humanos ocurrió 30.000 a 15.000 años atrás, cuando se pobló el continente [8, 28].

El descubrimiento científico de esta dolencia ocurrió recién en 1909 de la mano del médico brasileño Carlos Chagas (1879-1934) [29-31]. Este hallazgo se inscribió de manera especial en la historia de la medicina debido a que, de manera excepcional, un mismo investigador describió al ciclo completo de transmisión (vector, hospedador y patógeno), las manifestaciones clínicas de la infección del primer caso humano reportado y el impacto social de la enfermedad [18, 32]. Hacia 1926, Salvador Mazza (1886-1946) en Argentina, retomó las investigaciones de Chagas, dedicándose al estudio de distintos aspectos de la problemática. Sus hallazgos en contexto de la Misión de Estudios de Patología Regional Argentina resaltaron la importancia sanitaria de esta endemia y especificaron sus formas clínicas [33-36].

El ensayo de fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas comenzó tan pronto como el descubrimiento de la enfermedad, pero sin resultados efectivos. Llevó 50 años el desarrollo de dos compuestos para la quimioterapia de la tripanosomiasis americana: En 1966 Hoffman-La Roche introdujo el Benznidazol; y en 1970 Bayerin comercializó Nifurtimox. Desde entonces son los únicos medicamentos disponibles para el tratamiento etiológico de la enfermedad (revisado por Steverding y col. [32]). A pesar de sus efectos secundarios indeseados, la limitación más importante de estos fármacos es que sólo han mostrado ser parcialmente eficaces en la etapa crónica de la dolencia [37].

Los aspectos biomédicos de la enfermedad de Chagas, que abarcan la biología del parásito y su vector, y los aspectos médicos como manifestaciones clínicas, diagnóstico, tratamiento, entre otros; han sido profusamente estudiados por más de 100 años [29]. Si bien aún no se ha logrado el desarrollo de vacunas que resulten eficaces para evitar la infección o nuevos fármacos efectivos en la cronicidad, mucho se ha avanzado [38, 39]. Al respecto, la secuenciación del genoma parasitario se configura como uno de los hallazgos más relevantes en los últimos años [40]. Las lecciones hasta ahora aprendidas, conforman el punto de partida para el desarrollo de nuevos conocimientos y opciones preventivas y/o terapéuticas.

### *La biología del parásito*

El ciclo de vida del parásito es complejo e involucra varias formas de desarrollo en los insectos vectores y en los hospedadores mamíferos [9]. El insecto se infecta al alimentarse de sangre contaminada con tripomastigotes (forma circulante del *T. cruzi*). Luego, en el tracto digestivo del vector, el *T. cruzi* se transforma en epimastigote (forma replicativa) y finalmente en tripomastigote metacíclico (forma infectiva). Al alimentarse nuevamente, el triatomino infecta a un nuevo hospedador mamífero, donde se multiplica en forma de amastigote y circula como tripomastigote [1, 41]. Además de sus distintas formas de desarrollo, el *T. cruzi* presenta gran variedad de cepas que han sido recientemente agrupadas en base a marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos en seis categorías o “*Discrete Typing Units*” (DTU) TcI-VI [42, 43]. Las características biológicas de las cepas y clones de *T. cruzi*, especialmente el tropismo hacia ciertos tejidos, participan como determinantes de la patología [9, 44].

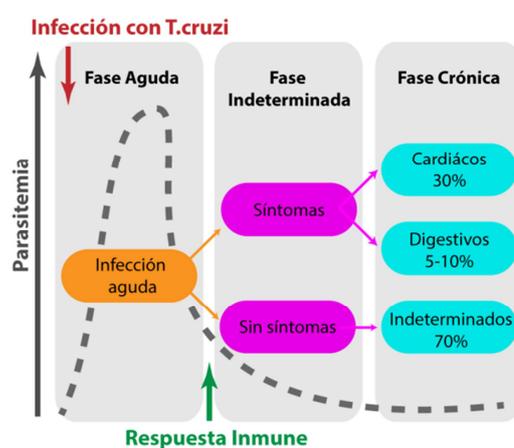
### *Manifestaciones clínicas*

La etapa aguda de la enfermedad de Chagas se caracteriza por manifestaciones clínicas inespecíficas como síndrome febril auto-limitado y la presentación eventual de un “chagoma de inoculación” o “signo de Romaña” (edema que evidencia el sitio de ingreso del parásito). Este período de la enfermedad cursa con grandes cantidades de tripomastigotes y tiene una duración aproximada de 4 a 8 semanas. Una baja proporción de la población infectada, generalmente niños o adultos inmunosuprimidos, presenta un cuadro infeccioso agudo severo con miocarditis y/o meningoencefalitis [1, 15, 45]. Mientras tanto, la mayoría de las personas desarrolla una fuerte respuesta inmune capaz de controlar la parasitemia y evoluciona a la fase indeterminada de la

enfermedad (figura 2) [46]. Esta etapa tiene una duración aproximada de 10 a 30 años y cursa de manera asintomática, a pesar de la persistencia del parásito en los tejidos. Aproximadamente un tercio de los pacientes infectados evoluciona a la fase crónica de la enfermedad, en donde se presenta la sintomatología característica: alteraciones electrocardiográficas e insuficiencia cardíaca progresiva e irreversible; y/o alteraciones digestivas (megaesófago y/o megacolon) [9, 47, 48]. El 30% de las personas infectadas desarrolla la patología cardíaca y en un tercio de ellas se presentan formas letales de miocardiopatía dilatada con disfunción ventricular, insuficiencia cardíaca y arritmia [49]. Es interesante mencionar que el compromiso cardíaco es la manifestación crónica más frecuente e importante en Argentina [50]. Por su parte, la patología digestiva ocurre en un 5-10% de las personas infectadas y cursa con alteraciones en las funciones motoras, secretoras y de absorción del esófago y el tracto gastrointestinal [15]. La reactivación de la enfermedad por inmunodeficiencia adquirida (co-infección con el virus de la inmunodeficiencia humana en la mayoría de los casos), o tratamiento inmunosupresor también se ha reportado, y transcurre con sintomatología propia que se asemeja a la de la infección aguda [9, 51].

### Patogénesis de la enfermedad

En relación a que la infección con *T. cruzi* comprende un amplio espectro de manifestaciones clínicas, es interesante ahondar respecto de los distintos factores que determinan la patología. La patogénesis de la enfermedad de Chagas es muy compleja y multifactorial, depende tanto de características del parásito como del hospedador [52]. Se han postulado cuatro mecanismos principales para explicar el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica (su manifestación crónica más relevante): 1) alteraciones en la



**Figura 2. Evolución clínica de la enfermedad de Chagas.** A los pocos días de la infección con *T. cruzi* el hospedador presenta altas parasitemias y síntomas inespecíficos (fase aguda). El 75% de las personas que reciben el tratamiento antiparasitario en esta etapa, logran erradicar al parásito. En los demás casos los pacientes son capaces de montar una fuerte respuesta inmune que controla al parásito pero no lo elimina por completo y luego de 2-4 meses de infección evolucionan a una fase asintomática (indeterminada) que dura de 5-10 años. Posteriormente sobreviene una etapa crónica, donde una parte de la población infectada desarrolla la sintomatología clásica de la enfermedad: trastornos cardíacos y digestivos. Adaptado de Dutra y col. [46].

microvasculatura (lesiones en la microvasculatura y su consecuente isquemia), 2) daño del sistema nervioso autónomo (destrucción de neuronas parasimpáticas post-ganglionares desencadenadas por el parásito), 3) agresión miocárdica dependiente del parásito, y 4) lesión mediada por el sistema inmune (revisado por Martin-Neto y col. [53]). Aunque trastornos autonómicos y alteraciones de la microcirculación constituyen características distintivas de la patología crónica, parecen jugar un rol auxiliar más que fundamental en la patogénesis de la enfermedad [54]. Mientras tanto, las lesiones cardíacas dependen inexorablemente de una infección sistémica leve, pero incesante y de una respuesta inflamatoria crónica [54]. La persistencia del parásito en los tejidos ha sido fehacientemente corroborada por inmunohistoquímica y PCR de tejidos en pacientes crónicos [55]. Asimismo, resultados preliminares de dos ensayos clínicos recién completados o cerca de su finalización (TRAENA y BENEFIT), demuestran que el tratamiento etiológico de pacientes crónicos resulta beneficioso [56]. Por otro lado, se conoce que frente al parásito se sostiene una inflamación crónica de grado variable que eventualmente expone autoantígenos o bien genera mimetismo molecular [52]. Así, la presencia de autoanticuerpos en pacientes y animales de experimentación llevaron a asociar la patología de la enfermedad de Chagas a fenómenos de autoinmunidad [57]. Por su parte, se ha reportado que mayores grados de inflamación se asocian a peores pronósticos. Sin embargo, la contribución relativa de cada uno de estos factores (parásito y sistema inmune), es discutida ya que reportes recientes dan cuenta de que la respuesta inflamatoria disminuye al mermar o erradicarse el parásito [58]. Estos datos respaldan el hecho de que los autoanticuerpos y la inflamación son factores necesarios pero no suficientes para desarrollar la patología. Sin embargo otras investigaciones en donde se transfieren células de un ratón infectado (libres de parásitos), a un ratón no infectado, reproducen las manifestaciones de los animales enfermos. En relación a estas y otras discrepancias en el tema, la patogénesis la enfermedad de Chagas no ha sido completamente establecida y es en la actualidad un campo activo de investigaciones (revisado en Machado y col. [58]).

Teniendo en cuenta que la respuesta inmune participa tanto en el control del parásito como en la patología asociada a la infección con *T. cruzi* y que eventuales propuestas de intervención como vacunas o nuevas terapias podrían hacer uso de la misma, es clave profundizar su conocimiento [37, 59, 60]. Al respecto es interesante mencionar que mucha de la información con la que se cuenta deriva de estudios que utilizan modelos de infección experimentales, particularmente ratones. Si bien en un

principio costó generar un modelo que lograra una clara asociación con la cardiomiopatía chagásica crónica observada en pacientes, muchas observaciones importantes respecto de la respuesta inmune en la etapa aguda han surgido a partir de estudios en ratones. Más aún, el desarrollo reciente de nuevos modelos experimentales de la enfermedad de Chagas, permiten avanzar en el conocimiento de la patología crónica (revisado por Chatelain y Konar [61]).

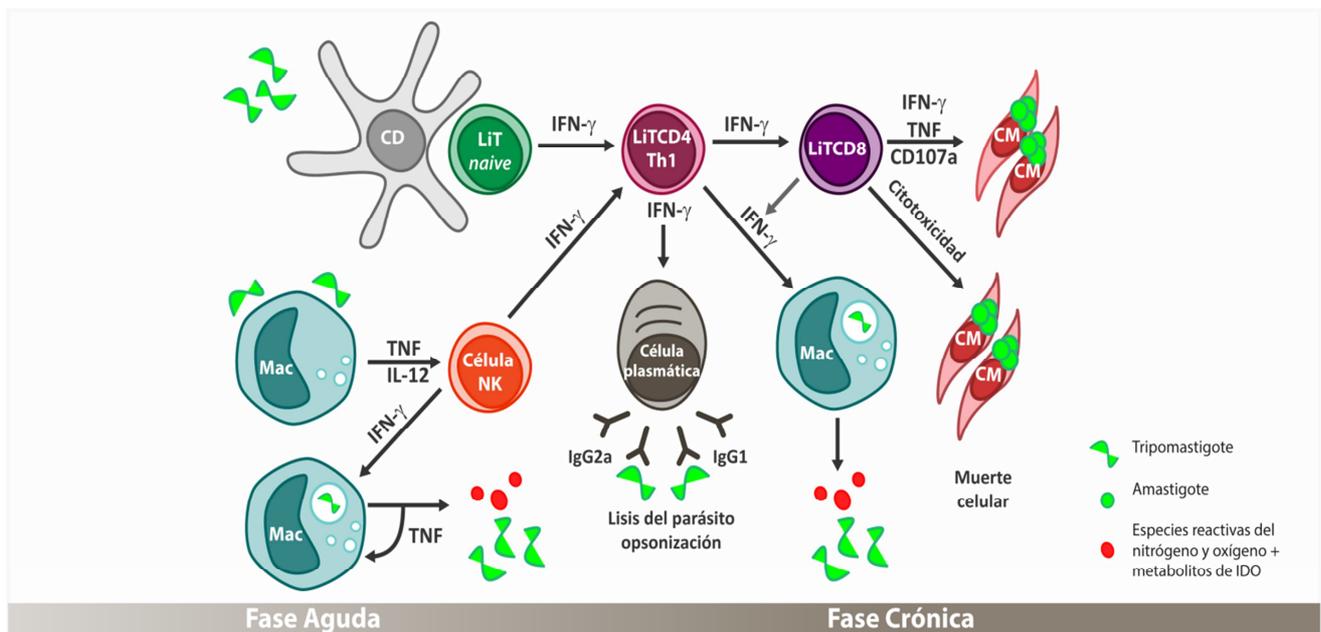
### Respuesta inmune frente a *Trypanosoma cruzi*

El control inmunológico de patógenos es uno de los aspectos claves de supervivencia de especies tan primitivas como las esporas. La constante exposición a microorganismos ha presionado evolutivamente a desarrollar mecanismos eficaces de identificación y eliminación de agentes potencialmente dañinos. Así, vertebrados superiores y mamíferos cuentan con un complejo sistema de órganos, tejidos, células y moléculas para hacer frente a estos patógenos. Ante cualquier infección, los componentes del sistema inmune innato rápidamente proporcionan una primera línea de defensa. Sin embargo, no siempre pueden eliminar completamente a los microorganismos. Los linfocitos del sistema inmune adaptativo han evolucionado para proporcionar una respuesta que, aunque se presenta de forma relativamente demorada, es más precisa para combatir al microorganismo invasor y proporciona una protección de memoria frente a una reinfección posterior con el mismo patógeno. A pesar de la especialización de la respuesta inmunitaria, existe una constante coordinación y relación dinámica entre sus componentes. Las células del sistema inmune innato, por ejemplo, desempeñan un papel crucial en la iniciación y posterior dirección de la respuesta inmune adaptativa, y participan en la eliminación inicial de patógenos que luego serán combatidos más específicamente. Es interesante considerar que, al mismo tiempo que el sistema inmune se fue complejizando, los agentes infecciosos desarrollaron diversos mecanismos de resistencia que les permitieron evadirlo (revisado por Medzhitov y Janeway [62] e Iwazaki y Medzhitov [63]).

Los protozoos son un grupo de organismos eucariotas muy antiguo, que ha evolucionado a lo largo de los años hasta convertirse en una de las formas de vida dominantes en la tierra. La antigua relación entre el protozoario *T. cruzi* y sus diversos hospedadores mamíferos ha ejercido presión evolutiva a favor de una infección crónica (revisado por Nardy y col. [64]). Frente a *T. cruzi* los mamíferos desarrollan una respuesta inmune robusta que, si bien logra controlar las cantidades de parásito circulante al punto de tornarse indetectables en sangre, no es capaz de eliminarlo totalmente. En tal

sentido, se ha demostrado que, tras largo tiempo de infección, *T. cruzi* continúa replicándose intracelularmente en algunos tejidos. Así, el hospedador establece de por vida un equilibrio dinámico con el protozoo que resulta en diferentes desenlaces clínicos [9, 65].

La resistencia a la infección con *T. cruzi* depende del efecto combinado de la inmunidad innata y adaptativa (figura 3) [66]. Células *Natural Killer* (NK), macrófagos y células T CD4+ y CD8+, intervienen activamente [67]. Asimismo un gran número de citoquinas, quemoquinas, anticuerpos, y otros factores solubles son necesarios para orquestar una respuesta inmune eficiente contra esta infección parasitaria.



**Figura 3. Respuesta inmune frente a *T. cruzi*.** Al ingresar al hospedador mamífero, el *T. cruzi* es reconocido por células de la inmunidad innata, entre ellas las células dendríticas (CD) y macrófagos (Mac). Los Mac fagocitan el parásito, se activan y producen grandes cantidades de especies reactivas del nitrógeno y oxígeno así como metabolitos de IDO, capaces de ejercer citotoxicidad directa sobre el protozoo. Además los Mac activados producen IL-12 y TNF que estimulan a las células NK para que liberen IFN- $\gamma$ , favoreciendo la activación de un mayor número de macrófagos y condicionando la respuesta de linfocitos T. Las CD inician la respuesta inmune adaptativa presentando antígenos a los linfocitos T *naive*. En el contexto de grandes cantidades de IL-12 e IFN- $\gamma$  se desarrolla una potente respuesta Th1 (LiTCD4 Th1) que colabora en la activación de macrófagos y en una respuesta humoral. En esta respuesta predomina la producción de IgG2a e IgG1 específicos que participan en la opsonización y lisis del parásito. Mientras tanto se genera una respuesta citotóxica de linfocitos T CD8+ (LiTCD8) que es crucial para el control del parásito en células musculares (CM), principales blanco de la infección crónica, y tejido en general. Adaptado de Junqueira y col. [66].

*Inmunidad innata*

Inmediatamente después de que el parásito ingresa al organismo, invade gran variedad de células nucleadas, particularmente, las del sistema retículo endotelial. Al cabo de algunas semanas, la infección se vuelve sistémica. El fenómeno de invasión involucra diversas formas del parásito y variados mecanismos. Aunque no han sido completamente descritas las moléculas de *T. cruzi* y los receptores del hospedador que inducen su internalización celular, se conoce que en este proceso está involucrado un compartimento de membrana (vacuola parasitófora) que, tras fusionarse con un lisosoma, permite el escape del protozoo hacia el citosol (revisado por Fernandes y Andrews [68]).

Diversos autores sostienen que la persistencia crónica del parásito en el hospedador está estrechamente ligada a su capacidad de replicarse intracelularmente y evadir así el reconocimiento del sistema inmune [68]. A pesar de ello, el parásito se expone al reconocimiento por parte del sistema inmune innato desde los momentos iniciales de la infección. Luego de la ruptura de la barrera epitelial, los tripomastigotes se encuentran con células residentes (de origen inmune y no inmune) que mediante receptores de reconocimientos de patrones (PRRs, de sus siglas en inglés) detectan la presencia de moléculas altamente conservadas en microorganismos patogénicos (patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs de sus siglas en inglés). Varias familias de PRRs reconocen a *T. cruzi*, entre ellas: receptores de tipo lectina, receptores tipo NOD (NLR), receptores tipo RIG (RLR) y receptores tipo Toll (TLR) (revisado por Tarleton [69]). Si bien la respuesta inmune innata, de forma independiente de TLRs, produce interferones (IFN) tipo I e IFN- $\gamma$ , activa al inflamosoma y a GTPasas inducibles por IFN (importantes funciones en la inmunidad contra el protozoario) [66, 70, 71]; los TLR han sido los PRRs más estudiados en esta infección y su importancia en la misma ha sido ampliamente demostrada. A modo de ejemplo, se ha evidenciado que ratones que carecen de moléculas que intervienen en la señalización de los TLRs, como son MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) y TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ), presentan una susceptibilidad extrema a la infección [72]. Se ha descrito que muchas moléculas de *T. cruzi* se unen a TLR, entre ellas se destacan: las mucinas ancladas a membrana por glicofosfatidilinositol (GPI) y la proteína Tc52 que se unen a TLR-2/6; el glicofosfatidilinositol libre de anclaje (GPL) que se une a TLR-4; el ácido desoxirribonucleico (ADN) rico en motivos CpG que se une a TLR-9; y los residuos de ácido ribonucleico (ARN) que se unen a TLR-7 [66, 72, 73]. La interacción entre los receptores TLR y sus ligandos activan la

producción de mediadores pro-inflamatorios como IFN- $\gamma$ , interleuquina (IL)-12, IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF) y óxido nítrico (NO), aunque también pueden promover la liberación de moléculas anti-inflamatorias como IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) [74, 75]. Dada la importancia de TLR-7 y TLR-9 en la respuesta inflamatoria en la infección, se ha propuesto que ARN y ADN serían los principales PAMPs de este parásito (revisado por Junqueira y col. [66]).

La activación de células del linaje monocítico por moléculas parasitarias, provoca la liberación de mediadores pro-inflamatorios que incluyen las citoquinas IL-12 y TNF, quemoquinas y NO. La IL-12 estimula la amplificación de la síntesis de IFN- $\gamma$  por parte de las células NK, promueve la generación de respuestas adaptativas de perfil Th1 (perfil colaborador de linfocitos T CD4+) y, a modo retroalimentación positiva, estimula a los macrófagos a que produzcan IL-12, TNF, NO y quemoquinas (figura 3). El IFN- $\gamma$  activa clásicamente a los macrófagos, quienes juegan un rol clave en el control del crecimiento intracelular del parásito [74, 76]. Los macrófagos activados producen, por acción de las enzimas óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS, de sus siglas en inglés) e indoleamina dioxigenasa (IDO), NO y metabolitos de L-kynurenina respectivamente, que son citotóxicos o citostáticos para el parásito [77, 78]. La importancia de estos mediadores se refleja en la alta susceptibilidad a la infección que muestran animales que carecen independientemente de IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF, iNOS o IDO [76, 78, 79]. Es importante mencionar que las especies reactivas del oxígeno (ROS), producidas por macrófagos y neutrófilos activados, también participan de forma crítica en la destrucción del parásito y en la inducción de la producción de citoquinas. Efectos similares han sido descritos para otros mediadores como eicosainoides [74, 80].

La respuesta inmune innata en la infección cuenta con monocitos/macrófagos, pero también con la participación de otros leucocitos como las células NK y NKT (células T tipo NK), y los neutrófilos, entre otros (revisado por Machado y col. [74]). Particularmente, las células NK limitan la propagación de la infección a través de la actividad citotóxica sobre la forma circulante de *T. cruzi* y la producción de IFN- $\gamma$  [81, 82]. Por su parte, los neutrófilos son reclutados tempranamente en la infección y colaboran en la erradicación del parásito [83, 84]. Se ha descrito al respecto que éstos producen especies reactivas de nitrógeno y oxígeno en respuesta a la activación de sus TLR (en especial TLR-2) [74]. Sin embargo, el papel de los neutrófilos en la infección es discutido y, en modelos de laboratorio, se supedita a la cepa

de ratones. Por otro lado, células no inmunes como células endoteliales y cardiomiocitos también responden tempranamente a *T. cruzi* y participan en la producción citoquinas inflamatorias [85].

Otro tipo celular que participa en la respuesta inmune frente a *T. cruzi* y que cobra relevancia en la activación de la inmunidad adaptativa, son las células dendríticas. Éstas activan TLR-2 y TLR-9 frente al parásito y consecuentemente secretan IL-12, al tiempo que aumentan la expresión de moléculas co-estimuladoras [69]. De esta forma las células dendríticas colaboran con las células del linaje monocítico y al mismo tiempo modulan la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia un perfil Th1, favorecen el desarrollo de la respuesta T CD8+, y propician la respuesta de células B [66, 86-88]. Sin embargo, gran cantidad de reportes dan cuenta que el parásito altera la expresión de moléculas co-estimuladoras y la funcionalidad de estas células, propiciando un fenotipo regulatorio, caracterizado por la producción de IL-10 y TGF- $\beta$  [89, 90].

En el contexto de la producción de mediadores solubles, se ha descrito que proteínas catiónicas, transferrina y otras proteínas del sistema de complemento activadas por la vía alternativa, tienen actividad citotóxica sobre formas de *T. cruzi*. Por su parte, las citoquinas IL-12, TNF, IFN- $\gamma$ , como así también IFNs tipo I, no modifican directamente la viabilidad del parásito, pero si indirectamente, colaboran en su control activando macrófagos y otros mecanismos efectores [91]. De forma adicional las quemoquinas adquieren particular importancia para la atracción de leucocitos a los sitios de infección y la protección frente al parásito, aunque también pueden contribuir al eventual daño de tejidos. Se ha visto por ejemplo, que la ausencia de CCR5 (receptor de CCL3, CCL5, CCL8 y CCL14) compromete la migración de células T CD4+ y CD8+ a corazón, lo que resulta en una clara susceptibilidad a la infección (revisado por Machado y col. [58]). Por otro lado, mayores concentraciones de CXCL10 (IP-10) han correlacionado con la patología crónica en pacientes infectados [92]. Aunque se desconoce el rol de muchas de estas moléculas en la infección, su fuerte inducción por el parásito fue evidenciada por estudios transcripcionales de células epiteliales expuestas a *T. cruzi*, que indicaron que ocurre una profunda reprogramación con expresión de genes que codifican quemoquinas (particularmente CXCL1, CXCL2 e IL-8, moléculas involucradas en el reclutamiento de células fagocíticas y neutrófilos) [93].

Mientras el sistema inmune intenta combatir a *T. cruzi*, éste impide la rápida liberación de proteínas del complemento y ejerce efectos inhibitorios sobre el sistema mononuclear fagocítico [94]. En el

mismo sentido, se ha reportado que el parásito secreta moléculas regulatorias y expresa otras que sólo activan débilmente a los TLR (como GPI y GPIL). En este contexto se favorece la secreción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- $\beta$  por parte de los macrófagos, que impiden el desarrollo de una respuesta inmune potente y favorecen la diseminación de la infección al tiempo que protegen los tejidos de una respuesta inflamatoria exacerbada [64, 95]. Por otra parte, estudios recientes sugieren que una pobre expresión de PAMPs en el parásito vivo retarda 4 a 5 días la generación de una respuesta inmune potente, y que la activación intensa de la inmunidad innata y el desarrollo de la inmunidad adaptativa acontecen en respuesta a moléculas asociadas a daño (DAMPs) que el hospedador expone, más que al reconocimiento de PAMPs en el parásito [96].

### *Inmunidad adaptativa*

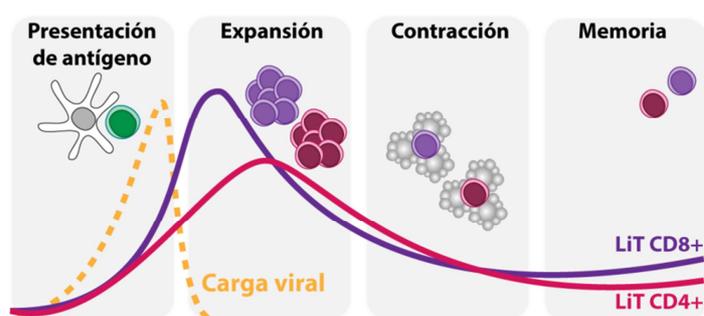
La respuesta inmune adaptativa, más tardía en la infección, comprende la activación de dos grandes grupos de células: Los linfocitos B (encargados de producir anticuerpos, secretar citoquinas y quemoquinas, presentar antígenos y modular a las células dendríticas y subpoblaciones T) y los linfocitos T (que divididos en CD4+ y CD8+, se ocupan tanto de producir citoquinas y quemoquinas que modulan la producción de anticuerpos y la activación de distintas poblaciones celulares, como de ejercer citotoxicidad de células infectadas). Los linfocitos B y los T, poseen receptores altamente específicos, necesitan activarse y proliferar, y tienen capacidad de proteger más rápida y efectivamente ante subsecuentes infecciones con el mismo patógeno (revisado por Parkin y Cohen [97]).

La activación de los linfocitos B requiere del reconocimiento directo de su antígeno a través de su receptor (BCR), la colaboración T (en el caso de las respuestas T dependientes) y la presencia de citoquinas. Juega un rol clave en tal proceso, la subpoblación de linfocitos T CD4+ foliculares [98]. Tras activarse, los linfocitos B proliferan y se diferencian a célula plasmática productora de anticuerpos (figura 3). La respuesta de anticuerpos frente al *T. cruzi*, principalmente la producción de inmunoglobulina G (IgG) de isotipo IgG2a, IgG2b y secundariamente IgG1, ayuda a controlar la propagación de la infección [74, 99]. Se ha reportado que los anticuerpos de suero de mamíferos infectados son capaces de: reducir la parasitemia, prolongar la supervivencia ante una re-infección, facilitar la fagocitosis (opsonizar) y provocar la lisis del parásito tanto por activación del complemento, como por citotoxicidad dependiente de anticuerpos [100]. Por otro lado, se ha documentado la presencia de

anticuerpos líticos en el suero de pacientes y animales infectados [101]. Se conoce también que las células B producen quemoquinas y citoquinas que participan en el reclutamiento de linfocitos T CD4+ y CD8+ a órganos linfáticos, la generación y sostenimiento de células T efectoras y de memoria; y presentan antígenos a los linfocitos T CD8+. Así las células B inducen globalmente una inmunidad protectora sistémica y local frente al parásito [100]. Como mecanismo de evasión, el *T. cruzi* induce una potente activación policlonal de los linfocitos B, que restringe el nicho para el desarrollo de una respuesta antígeno específica adecuada y genera grandes cantidades de anticuerpos no específicos [64, 102]. Es relevante mencionar también que la presencia de auto-anticuerpos en la infección ha sido relacionada con patogénesis de la enfermedad [57].

Por otra parte, los linfocitos T son capaces de unir su antígeno específico, sólo si éste se encuentra en contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), sobre la superficie de células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales (células dendríticas, macrófagos o linfocitos B) [103]. De forma sinérgica al antígeno, las CPAs brindan otras dos señales de activación adicionales: co-estímulo y citoquinas. Las células T CD8+ y CD4+ expresan receptores de células T (TCR) que se unen a péptidos presentados en CMH tipo I y II respectivamente. Mientras que los linfocitos T CD8+ activados se diferencian a células citotóxicas con capacidad de destruir células infectadas y producir citoquinas; los linfocitos T CD4+ se diferencian en distintas poblaciones colaboradoras (Th, del inglés *T helper*) que regulan la función de linfocitos B y T, así como de células NK, CPA, fagocitos y células no inmunes [104, 105].

El desarrollo de la tecnología de multímeros de CMH/Antígeno conjugados a fluorocromos hizo posible trazar la cinética de la respuesta T específica a lo largo de distintos procesos inmunológicos. La respuesta de los linfocitos T tras su activación en infecciones virales, modelo clásico de



**Figura 4. Cinética de respuesta de Linfocitos T en infecciones virales auto-limitadas.** Frente a una infección viral típica, las CPA presentan al antígeno a los linfocitos T *naive*. Los linfocitos que reconocen específicamente al antígeno se expanden y diferencian a células efectoras que controlan al patógeno. Una vez erradicado el microorganismo, los linfocitos T atraviesan una fase de contracción masiva de la respuesta, donde muchas células mueren por apoptosis y sólo sobreviven células de memoria, que resultan protectoras ante una eventual reinfección con el mismo patógeno. Adaptados de Kurtulus y col. [106].

estudio de la dinámica de respuesta T, se caracteriza secuencialmente por una fase de expansión masiva, donde las células específicas sufren unas 15 a 20 rondas de división; una etapa de contracción, donde muere por apoptosis el 80-90% de los linfocitos generados; y una última fase de mantenimiento de células de memoria (Figura 4) [106]. Se considera que la extensión de la infección y la tasa de erradicación del patógeno determinan tanto la expansión como la contracción homeostática de la respuesta. Actualmente se conoce que en las infecciones agudas, la declinación de la respuesta T ocurre justo después de que se ha logrado erradicar al patógeno (Figura 4), mientras que la dinámica T frente a infecciones persistentes es aún tema de estudio [107]. Se ha descrito en tal sentido que distintos protozoarios tienen la capacidad de demorar el desarrollo de la respuesta T a través de la inhibición de señales de las CPA; y de subvertir el mecanismo de formación de memoria. De esta forma los protozoos como *T. cruzi*, interfieren a corto y largo plazo con el control que el sistema inmune ejerce frente a ellos [108]. A pesar de esto, el fuerte compromiso de la sobrevivencia de ratones infectados con *T. cruzi* en ausencia de células T CD4+, T CD8+ o ambas, da cuenta de su vital importancia en el control del parásito (revisado por Junqueira y col.[66]).

Luego de reconocer a su antígeno y recibir su segunda y tercera señal (co-estímulo y citoquinas), los linfocitos T CD4+ se diferencian a poblaciones con características y funciones específicas, capaces de regularse mutuamente [105, 109]. La existencia de linajes de Th con funciones especializadas es dimensionada como una ventaja evolutiva en el contexto de las infecciones, ya que se propicia la generación de células eficientes para el control de cada tipo de patógenos [104]. Particularmente, en presencia de las altas concentraciones de las citoquinas IL-12 e IFN- $\gamma$ , producidas por células dendríticas activadas con *T. cruzi*, así como por otras células del sistema inmune antes descritas, tiene lugar la diferenciación de linfocitos T CD4+ a un perfil Th1. Los linfocitos Th1 se caracterizan por producir preferencialmente IFN- $\gamma$  (aunque también tienden a secretar IL-2 y TNF) bajo un programa transcripcional característico determinado por la expresión del factor de transcripción maestro T-bet (T-box transcription factor, TBX21), y ser eficientes en el control de microorganismos intracelulares [104]. En contexto de la infección con *T. cruzi*, el IFN- $\gamma$  producido por esta subpoblación celular es clave para el control del parásito, en tanto promueve el reclutamiento y la activación de células con funciones fagocíticas como los macrófagos y neutrófilos, la diferenciación de linfocitos B a células

plasmáticas productoras de anticuerpos específicos de isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b (protectores en la infección) y la diferenciación y activación de linfocitos T CD8+ [66, 74, 100] (figura 3).

A pesar de su papel en el control de la replicación parasitaria, respuestas inflamatorias exacerbadas con alta producción de IFN- $\gamma$  y TNF han sido asociadas a la patogénesis de la enfermedad [110, 111]. En este sentido, estudios realizados en pacientes con enfermedad de Chagas revelaron que mayores respuestas inflamatorias tipo 1 e incrementada expresión de receptores de quemoquinas inducidos por IFN- $\gamma$ , correlacionan con peores estadios clínicos de la patología cardíaca [58, 110-112]. Estos datos ponen en evidencia que la respuesta inmune frente a *T. cruzi* requiere, además de IFN- $\gamma$  y linfocitos Th1, mecanismos que limiten la inmunopatología [113, 114]. Por ejemplo, se ha reportado que citoquinas del perfil Th2 (IL-4) o inmunosupresoras (IL-10 y TGF $\beta$ ) modulan directa o indirectamente la respuesta inflamatoria acontecida frente a *T. cruzi*, así como la lesión tisular de ella derivada [58, 113-115]. Al respecto, deficiencias en la señalización o producción de citoquinas regulatorias como IL-10, correlacionaron con mayor inflamación y patologías más acentuadas, tanto en modelos animales como en pacientes. Por otro lado los linfocitos T CD4+ regulatorios (Treg), células con capacidad para limitar la inflamación y las respuestas celulares, juegan un papel controvertido en la infección con este parásito: mientras que algunos reportes describieron que su ausencia no tenía ninguna repercusión relevante [116, 117]; numerosos estudios en modelos experimentales y en pacientes dieron cuenta de su papel protector [82, 118, 119]. Los mecanismos de evasión del parásito a la respuesta T CD4+, y en general a la respuesta de células T, son: la atrofia tímica inducida por altos niveles de glucocorticoides que afectan la viabilidad de timocitos y provocan eliminación de clones por apoptosis (conocida como delección clonal), la liberación temprana de precursores T (CD4+CD8+ o bien CD4-CD8-), y la inducción de anergia [64, 108].

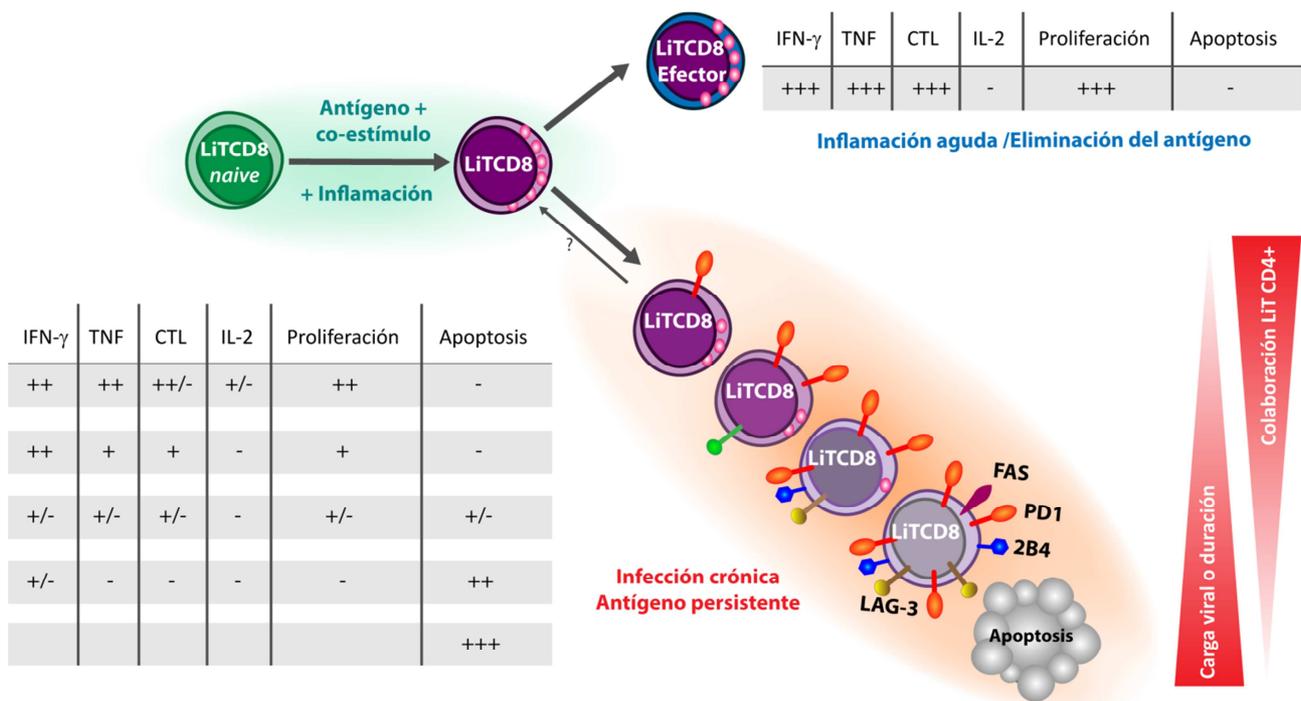
Respecto de la respuesta de linfocitos T CD8, típicamente las señales antígeno-específicas y co-estimuladoras requieren concomitantemente de citoquinas capaces de proporcionar una "tercera señal". Se ha demostrado en este sentido que, frente a variados contextos inmunes, esta última señal es esencial para dar lugar a una inmunidad citotóxica protectora caracterizada por la generación y expansión de poblaciones efectoras de corta vida (altamente funcionales y eficientes en la eliminación del patógeno); y de poblaciones de memoria (de larga vida y protectoras a largo plazo) [120]. Muchas citoquinas, incluyendo los IFN tipo I e IL-12, y esencialmente IL-2 e IL-21, están implicadas en la

regulación de diferentes aspectos de la biología de las células T CD8+, tales como la expansión, la adquisición de rasgos efectores y de memoria, y el mantenimiento a largo plazo [120-122]. La acción de las citoquinas en el desarrollo de linfocitos T CD8+ repercute en la expresión de factores de transcripción (FTs) que finalmente definen un programa transcripcional específico y, en consecuencia, el destino (efector o de memoria) de las células activadas.

La respuesta citotóxica mediada por células T CD8+ es crítica para el control de la infección con *T. cruzi*, si bien no lo suficientemente potente como para eliminar completamente al protozoo [9]. Particularmente en la infección con *T. cruzi*, se conoce que la respuesta CD8+ es muy importante para sostener niveles de IFN- $\gamma$  y además eliminar células infectadas en tejidos. Así, la importancia de estas células ha sido resaltada por reportes que dan cuenta de la notoria susceptibilidad a la infección que presentan animales que carecen de células T CD8+ o que no expresan  $\beta$ 2-microglobulina (molécula estructural de CMH-I) o moléculas efectoras como IFN- $\gamma$ , perforinas y granzimas (proteínas de los gránulos citotóxicos que median la función de lisis celular) [96, 123]. Cuando *T. cruzi* escapa de la vacuola parasitófora al citosol, grandes cantidades de antígeno quedan disponibles para el procesamiento y presentación vía CMH-I. Se han descrito un gran número de epitopes del parásito a ser reconocidos por los linfocitos T CD8+, sin embargo la respuesta CD8 se restringe sólo a unos pocos, en un fenómeno conocido como inmunodominancia [96, 123]. Dada la persistencia del parásito, se ha observado que la contracción de la respuesta es tardía y que las células mantienen características efectoras por largos períodos de tiempo. No obstante los esfuerzos para gatillar respuestas T CD8+ robustas, los mecanismos y las células responsables de la presentación antigénica, así como el rol de las citoquinas y los FTs en este proceso están poco esclarecidos. Más explorado en este campo, son los mecanismos de evasión dispuestos por el protozoo para impedir su erradicación por linfocitos citotóxicos. En tal sentido, la inmunidad sub-óptima de células T CD8+ específicas se atribuye a defectos cuantitativos y cualitativos tales como inmunodominancia [124, 125], retraso en la cinética de la respuesta específica contra el parásito [126, 127], inmunosenescencia [128], presencia de células T de memoria “adictas” al antígeno [129], y desarrollo de células T CD8+ efectoras propensas a la apoptosis [130].

De particular relevancia, junto con los mecanismos de anergia y apoptosis temprana que protozoos intracelulares son capaces de suscitar, se ha propuesto que estos microorganismos favorecen un

proceso de agotamiento celular [108]. Reportes recientes dan cuenta que pacientes chagásicos con severas manifestaciones crónicas de la enfermedad muestran alta frecuencia de células terminalmente diferenciadas, con alta expresión de receptores inhibitorios y baja funcionalidad, perfil compatible con células agotadas [131]. En los últimos años se ha establecido que las células T CD8+ activadas persistentemente durante infecciones crónicas adquieren un estado de disfunción celular denominado agotamiento celular. Bajo esta condición, las células experimentan una pérdida paulatina de las actividades efectoras y del potencial de proliferación, acompañada por la expresión sostenida de múltiples receptores inhibitorios. El proceso que lleva a tal estado es gradual e inicialmente se produce la pérdida de funciones como la producción de IL-2, la alta capacidad proliferativa y la citotoxicidad *ex vivo*, mientras que recién en etapas intermedias se pierde la capacidad para producir TNF. Sólo un agotamiento severo en las células antígeno-específicas conduce a la pérdida parcial o total de la



**Figura 5. Agotamiento paulatino de los linfocitos T CD8+ durante infecciones crónicas.** En contexto de infecciones, los linfocitos T CD8+ *naive* reciben las señales de antígeno-CMH, co-estímulo y citoquinas necesarias para activarse, expandirse y diferenciarse a un fenotipo efector capaz de producir citoquinas como IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 y ejercer citotoxicidad de células infectadas (CTL). Frente a infecciones agudas, auto-limitadas, los linfocitos T CD8+ (LiTCD8) adquieren un fuerte potencial efector y logran erradicar al antígeno. Mientras tanto, frente infecciones crónicas, la persistencia del antígeno y de señales inflamatorias desencadena la pérdida paulatina de funcionalidad (producción de citoquinas, CTL y proliferación), y finalmente mueren por apoptosis. Adaptado de Wherry [132].

capacidad de producir grandes cantidades de IFN- $\gamma$  y/o degranular, y finalmente se desencadena la muerte celular (Figura 5) [132]. Los linfocitos T CD8+ agotados que surgen durante infecciones crónicas no proporcionan una protección óptima y por tanto son, al menos en parte, responsables del control deficitario del patógeno (revisado en Wherry [132]). El estudio sistemático del perfil transcripcional de los linfocitos T CD8+ agotados permitió definir una huella genómica única, determinando las propiedades funcionales y fenotípicas de estas células. En este sentido, cabe destacar que muchos de los FTs necesarios para la normal diferenciación de las células T CD8+, como BATF (*Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like*), T-bet, Blimp-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*), y Eomes (Eomesodermin), también rigen su agotamiento [133-135]. Sin embargo, aún queda mucho por investigar para dilucidar cómo las señales y los mecanismos de regulación se integran en un programa transcripcional característico capaz de dirigir la diferenciación de los linfocitos T citotóxicos a un perfil completamente funcional o a uno agotado. La obtención de este conocimiento será relevante para definir estrategias de intervención capaces de revertir la disfunción celular en patologías crónicas [136].

### **Citoquinas de la familia de IL-17**

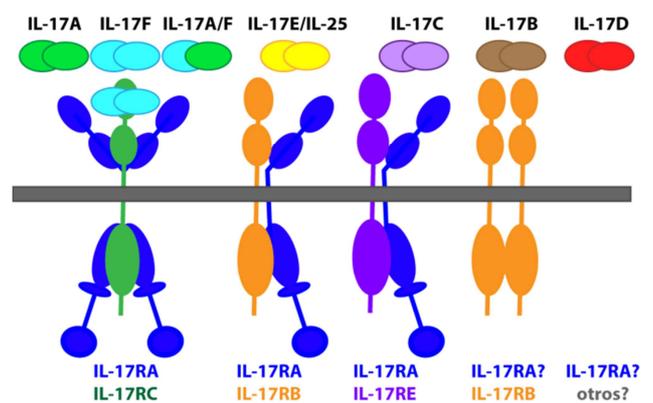
Las citoquinas son proteínas que juegan importantes roles en la comunicación celular actuando no sólo a nivel de las reacciones del sistema inmune, sino también en la hematopoyesis, el remodelamiento tisular, la angiogénesis y la reorganización de tejidos. Estas moléculas se caracterizan por: 1) ser secretadas por un gran número de células; 2) unirse a receptores; 3) desencadenar eventos intracelulares; y 4) producir efectos biológicos característicos. En relación a ciertas similitudes en la localización genómica, la estructura genética y los receptores utilizados, varias citoquinas se agrupan en familias. Cabe destacar que, a pesar de sus semejanzas, los miembros de una familia no necesariamente generan efectos biológicos análogos (revisado por Sabat y col. [137]).

La familia de IL-17 es un grupo único de citoquinas que proporciona una vía de conexión entre la respuesta inmune innata y adaptativa [138]. Desde el descubrimiento de IL-17A (también conocida como CTLA-8 o IL-17) en el año 1993, se han sumado a la familia otros cinco miembros: IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (o IL-25) e IL-17F [139-143]. Los genes que codifican a estos mediadores en mamíferos poseen moderadas similitudes, y sólo los que dan lugar a IL-17A e IL-17F (los miembros con mayor homología de la familia) se ubican en el mismo cromosoma tanto en humanos como ratones [137].

Si bien se observa una gran diversidad de secuencia entre las distintas IL-17, las mismas son agrupadas en una familia porque comparten un motivo C-terminal característico, donde cuatro de los cinco dominios cisteína conservados forman una estructura de “nudos de cisteína” que se diferencia de la descrita para otras súper familias [141, 144]. Mientras que las citoquinas IL-17A e IL-17F comparten una homología del 48,5%, la similitud entre IL-17A y los otros miembros es apenas cercana al 20% [144, 145]. Las diferencias hacia el extremo N-terminal que muestran IL-17B, IL-17C e IL-17E y la secreción de IL-17B como dímero no covalente, indicarían que las mismas pertenecen a una subclase distinta de las demás [144].

Es también inherente a las citoquinas IL-17 su señalización a través de un receptor compuesto por al menos dos subunidades, idénticas o diferentes, de la familia de receptores de IL-17 (IL-17R). Este grupo de receptores comprende cinco miembros: IL-17RA a IL-17RE; caracterizados por poseer dos dominios fibronectina tipo 3 en su porción extracelular y un dominio intracelular conservado SEF/IL-17R (SEFIR) (figura 6) [146, 147]. Un punto interesante en la

biología de este receptor, es que la vía de señalización comparte grandes similitudes con la de TLR/IL-1R [147]. IL-17RA ha sido propuesto como receptor común de la familia y se ha demostrado su participación en la señalización de cuatro de las seis citoquinas IL-17: IL-17A, IL-17C, IL-17E e IL-17F. Hasta el momento se ha descrito que IL-17A e IL-17F actúan en forma de homodímeros o heterodímeros a través del complejo IL-17RA/IL-17RC; mientras IL-17E gatilla señales a través del heterodímero de IL-17RA e IL-17RB. La subunidad IL-17RB también participaría como receptor de IL-17B, pero aún no hay evidencias respecto de su contraparte en el complejo receptor. Por otro lado, mientras se conoce que el heterodímero formado por IL-



**Figura 6. Familia de citoquinas IL-17 y sus receptores.** La familia de citoquinas IL-17 consta de seis miembros: IL-17A-F. Homodímeros de IL-17A, IL-17F o heterodímeros IL-17A/F señalizan a través del receptor IL-17RA/IL-17RC. Por su parte homodímeros de IL-17E e IL-17C señalizan a través de los receptores IL-17RA/IL-17RB e IL-17RA/IL-17RE respectivamente. Aunque se postula que IL-17RA es una subunidad común a los receptores de todas las IL-17, hasta ahora no se ha probado su participación en la señalización de IL-17B (que señalaría por un homodímero de IL-17RB) o IL-17D (cuyo receptor es aún desconocido). Adaptado de Gaffen [147].

IL-17RA e IL-17RE actúa como receptor de IL-17C, aún no ha sido develado el receptor de la citoquina IL-17D (revisado por Gaffen y col. [147, 148]). Por último, la subunidad IL-17RD, originalmente considerada como un regulador negativo, ha sido involucrada en la señalización positiva de IL-17A, aunque el mecanismo a través del cual esta interacción sucede es aún un tema poco estudiado. Al respecto, investigaciones recientes indican que IL-17RD regula negativamente la respuesta inducida por la señalización a través de receptores TLR, conocimiento que genera aún más intrigas respecto de su ligando y su mecanismo particular de acción [149].

Si bien IL-17A se describió por primera vez hace ya más de veinte años, gran parte del conocimiento acumulado hasta el momento respecto de la misma se sucedió desde 2005 cuando se propuso que estaba asociada a un nuevo linaje de linfocitos T CD4+, los linfocitos Th17. Así, las células Th17 rompieron con el paradigma dominante que planteaba una dicotomía Th1/Th2 en la respuesta efectora cooperadora y provocaron un profundo efecto en el campo de la inmunología [109, 150-153]. Los linfocitos Th17, y consecuentemente IL-17A, fueron tempranamente relacionadas a patologías autoinmunes [154]. Desde entonces las citoquinas IL-17A e IL-17F han sido activamente investigadas, y aunque han logrado independizarse de las células Th17, ampliado su función más allá de los fenómenos autoinmunes, y expandido su relevancia hacia sus compañeras de familia, mucho queda todavía por conocer en este campo.

Al momento se sabe que los integrantes de la familia son producidos por diferentes células y muestran patrones de expresión característicos. Además se conoce que, a pesar de sus diferencias, muchas veces las citoquinas IL-17 ejercen efectos que se superponen. Se ha demostrado también, que todas las citoquinas IL-17 juegan un papel importante en la regulación de la inflamación, aunque se sostiene que los mecanismos a través de los cuales actúan pueden variar de manera ligera o sustancial según el caso [146, 153, 155].

#### IL-17A, IL-17F e IL-17A/F

Inicialmente, IL-17A e IL-17F se asociaron a células T CD4+ de linaje Th17 [156]. Los linfocitos Th17 se definen como una subpoblación de LiT CD4+ diferenciada en el contexto de citoquinas como TGF- $\beta$  e IL-6 con requerimientos variables de IL-1 $\beta$ , IL-23 e IL-21, que expresa el factor de transcripción receptor huérfano asociado con el ácido retinoico (ROR)  $\gamma$ T, y produce preferencialmente IL-17A, IL-17F e IL-21

[157]. Aunque las células Th17 producen IL-17A o IL-17F, no lo hacen por el mismo mecanismo ni al mismo tiempo. En tal sentido, se conoce que normalmente, IL-17A se produce de forma más temprana que IL-17F [144]. De particular relevancia para la biología de IL-17A e IL-17F, IL-23 es capaz de sostener y expandir el perfil Th17, al tiempo que le imprime características asociadas con la patogénesis de algunas enfermedades autoinmunes [152]. Actualmente se conoce que tanto IL-17A como IL-17F son producidas por una amplia variedad de células que excede a los linfocitos Th17, como los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (conocidos como Tc17) y los linfocitos B; células de la inmunidad innata como los linfocitos T  $\gamma\delta$ , las células NK y NKT, las células linfoides innatas, las células T invariantes, los monocitos/macrófagos, los mastocitos y los neutrófilos (revisado por Song y Qian [146]). Dentro de estas últimas, la presencia constitutiva de ROR $\gamma$ t, IL-1R e IL23-R en las células NKT y en los linfocitos T  $\gamma\delta$  dan cuenta de su alta sensibilidad a diferenciarse a un perfil productor de IL-17 ante la presencia de IL-1 e IL-23. Además, dada la localización en mucosas de estas poblaciones, las convierten en la fuente inicial de IL-17A e IL-17F ante un estímulo y la primera línea de defensa frente a infecciones microbianas [158-160]. Por otro lado, se ha demostrado que células no inmunes, de tipo estromal, como por ejemplo células epiteliales y queratinocitos, son capaces de producir IL-17A e IL-17F. En tal sentido, es importante mencionar que en general todas las células tienen la capacidad de producir IL-17A e IL-17F en forma coordinada, aunque por ejemplo las células de Paneth sólo producen IL-17A, mientras que las células epiteliales del colon sólo producen IL-17F [161].

Como se ha mencionado con anterioridad, IL-17A, IL-17F y el heterodímero IL-17A/F, se unen al mismo receptor formado por las subunidades IL-17RA e IL-17RC. Sin embargo reportes previos han demostrado que en humanos IL-17A se une a IL-17RA con mayor afinidad que IL-17F, al tiempo que IL-17A y F se unen con similar afinidad a IL-17RC. Por otra parte en ratón se describió que la afinidad de unión de IL-17A e IL-17F a IL-17RA es similar, mientras que IL-17F se une preferencialmente a IL-17RC. Se postula además que si bien ambas citoquinas utilizan el mismo complejo receptor, gatillan señales intracelulares de distinta fuerza (revisado por Gu y col. [155]). Además IL-17RA muestra un patrón de expresión diferente respecto de IL-17RC: mientras que el primero es ubicuo y se expresa preferencialmente en células hematopoyéticas, el segundo se expresa generalmente en células no inmunes [162]. De forma llamativa una gran variedad de células es capaz de responder a IL-17A, IL-17F o IL-17A/F aunque sólo se haya detectado en ellas la expresión de un tipo de subunidad del receptor

heterodímero IL-17RA/C [163-165]. En el caso de las células inmunes, que expresan IL-17RA y no IL-17RC, es posible que IL-17RA actúe conjuntamente con IL-17RD como co-receptor. Otra alternativa es que IL-17RC se exprese efectivamente pero en niveles no detectables con las metodologías actuales, o bien que la expresión de IL-17RC se induzca bajo estímulos aún no precisados.

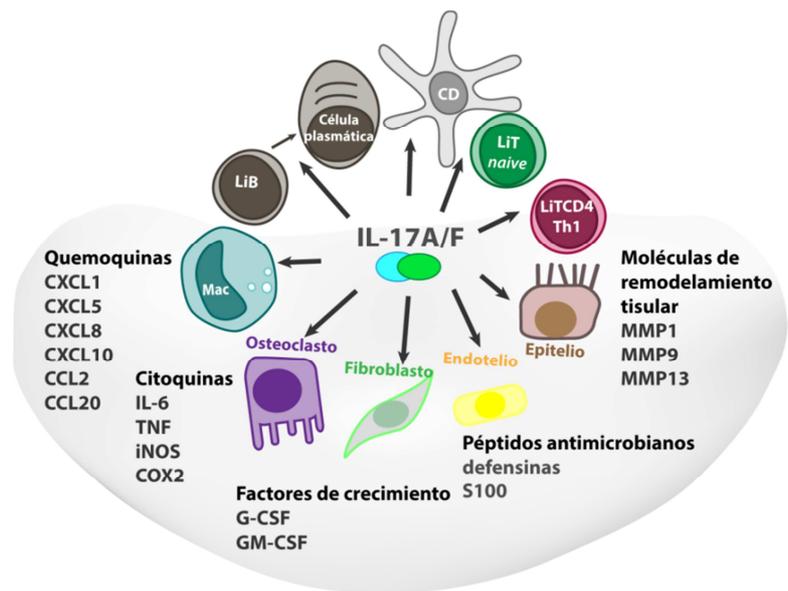
Análisis estructurales y funcionales de IL-17RA e IL-17RC demostraron que tanto el dominio intracelular conservado SEFIR como los dominios corriente abajo no conservados (conocidos como extensión del dominio SEFIR: SEFEX), son esenciales para la señalización de IL-17A e IL-17F. Ambas subunidades del complejo receptor reclutan a la proteína Act-1, que se une directamente a ellas a través de los dominios SEFIR. Luego, Act-1 recluta a TRAF-6 y la ubiquitina, lo que provoca la activación de TAK-1 y, finalmente, la de NF- $\kappa$ B. Además, la señalización de IL-17 activa componentes de la vía MAPK (p38, JNK y ERK1/2) y C/EBP (C/EBP $\beta$  y C/EBP $\gamma$ ) y alternativamente involucra Act-1, TRAF-2 y TRAF-5 (revisado por Gaffen y col. [148]). Es interesante destacar en relación a sus funciones biológicas, que la activación de NF- $\kappa$ B determina la producción de proteínas pro-inflamatorias como TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6; mientras que la activación de la vía MAPK interviene preferencialmente en la estabilización de ARNm tanto de las mismas citoquinas como de quemoquinas, y la vía C/EBP se relaciona particularmente con la producción de IL-6 [155, 162]. Es importante destacar que la ausencia de Act-1 compromete la señalización de todas las citoquinas de la familia IL-17 [166]. Además, si bien por su cuenta IL-17A (e IL-17F) son modestos activadores de la señalización, cumplen importantes funciones en la cooperación con otras moléculas pro-inflamatorias, particularmente TNF, pero también IFN- $\gamma$ , IL-22, linfotoxina, IL-1 $\beta$  y lipopolisacárido (revisado por Gaffen y col. [148]).

Las vías de señalización intracelular, como así también la capacidad de IL-17A de estabilizar el ARNm que codifica para muchas de las moléculas que promueve, desencadenan la liberación de moléculas pro-inflamatorias (por ejemplo: citoquinas, quemoquinas, péptidos antimicrobianos y metaloproteinasas) [167]. Más específicamente la bibliografía da cuenta del efecto de las citoquinas IL-17 sobre una amplia variedad de células innatas y estromales como: células epiteliales y endoteliales, fibroblastos, osteoblastos, células musculares, linfocitos NK, células dendríticas y macrófagos (revisado por Song y Qian [146]). Se ha visto en tal sentido, que tanto IL-17A como IL-17F y su heterodímero inducen la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias: TNF, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23. Se ha demostrado también que IL-17A, IL-17F e IL-17A/F tienen gran capacidad para estimular la producción

de numerosos péptidos antimicrobianos como  $\beta$ -defensina-2, S100A7-9 y mucinas, importantes para la defensa temprana frente a patógenos. La acción de IL-17A e IL-17F sobre células innatas y estromales promueve la producción de moléculas que intervienen en el remodelamiento tisular, la destrucción de la matriz extracelular y la angiogénesis, como las metaloproteinasas (MMP)-1, MMP-3, MMP-9 y MMP-13, y RANKL. Así mismo se ha reportado que IL-17A induce ICAM-1 en queratinocitos, iNOS y COX-2 en condrocitos, y también prostaglandina (PG)E2 y NO en una amplia variedad de tipos celulares. En sintonía con la actividad microbicida gatillada por IL-17A, un

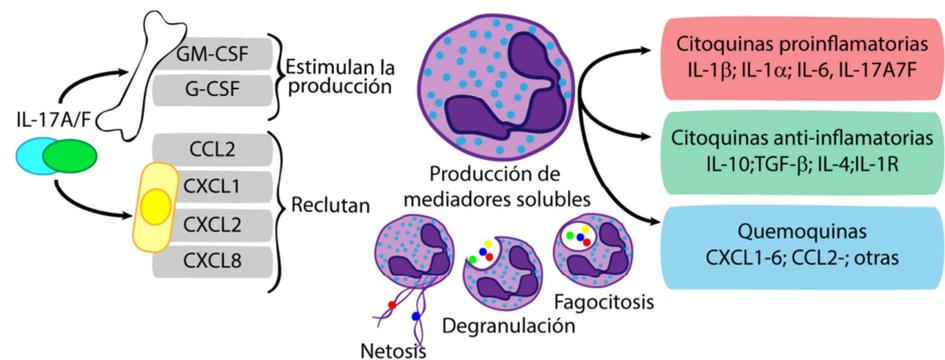
reporte reciente demostró que IL-17A influencia directamente la capacidad citotóxica de las células NK [168]. De manera relevante una de las funciones más estudiadas de IL-17A e IL-17F en la respuesta innata ha sido su capacidad de producir quemoquinas: CXCL1, CXCL5, IL-8 (CXCL8), CXCL10, CCL2, CCL7 y CCL20 (revisado por Isailovic y col. [161]) (figura 7)[169].

Una de las funciones más características de IL-17A, IL-17F e IL-17A/F es que promueven la granulopoyesis y maduración de neutrófilos [170, 171]. Se conoce que IL-17 estimula la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas del inglés) y del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) [172]. En este sentido se ha reportado que la sobre expresión de IL-17 provoca neutrofilia [173]. Asimismo, IL-17A y/o IL-17F



**Figura 7. Células blanco y efectos biológicos de IL-17A y/o F.** La IL-17A y/o F son producidas por células inmunes y no inmunes y ejercen múltiples efectos biológicos en gran variedad de células hematopoyéticas y no hematopoyéticas. Su efecto sobre leucocitos de la inmunidad innata y células estromales ha sido ampliamente estudiado. IL-17A y/o F desencadenan la producción de quemoquinas, citoquinas, factores de crecimiento, péptidos antimicrobianos y moléculas de remodelamiento tisular. El efecto de IL-17A /o F sobre la inmunidad adaptativa es menos conocido. Se sabe que estas citoquinas intervienen en la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas, que modulan la interacción entre la CPA y los linfocitos, y que actúan directamente sobre los linfocitos T inhibiendo respuestas Th1. Adaptado de Xu y Cao. [169].

participan de forma protagónica en el reclutamiento de neutrófilos a sitios de inflamación a través de la inducción de muchas quemoquinas, entre las que se destacan: CXCL1, CXCL2 y CXCL5 en ratones; y CXCL8 en humanos [137]. Más aún, el hecho de que la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos promueve la



**Figura 8. Estrecha relación de las citoquinas IL-17 y los neutrófilos.** Las citoquinas IL-17 actúan sobre células de médula ósea estimulando la maduración y liberación de neutrófilos. Al mismo tiempo estas citoquinas actúan sobre células estromales estimulando la producción de quemoquinas que atraen neutrófilos. Por su parte los neutrófilos, lejos de limitarse a la fagocitosis, desempeñan múltiples funciones: liberan trampas extracelulares a través de las cuales producen netosis, degranulan y producen un gran espectro de citoquinas y quemoquinas, entre otros. Adaptado de Mantovani y col. [175, 179].

granulopoyesis vía IL-17A e IL-23, ha llevado a postular que IL-17 participa activamente en el ciclo de vida de estas células [174, 175]. La significancia de este hecho reviste en que los neutrófilos son componentes importantes de la respuesta inflamatoria: son los primeros leucocitos en ser reclutados al sitio de inflamación, son capaces de eliminar a los patógenos a través de múltiples mecanismos (fagocitosis, producción de especies reactivas del oxígeno y netosis), coordinan la respuesta inmune innata y adaptativa, y participan en la resolución de la inflamación y respuesta inmune frente cáncer [176, 177]. A pesar de que fueron descritos hace más de 100 años como una célula de corta vida con limitada capacidad biosintética, los neutrófilos tienen una sobrevivencia mayor a la que un principio se concebía y presentan funciones adicionales a las clásicas. Por ejemplo, se ha demostrado que producen trampas extracelulares y ectosomas; liberan patrones de reconocimiento de patógenos solubles que actúan como anticuerpos ancestrales; e interactúan simultáneamente con distintos tipos celulares (macrófagos, células dendríticas, células NK y linfocitos) [178]. De particular importancia, los neutrófilos poseen gran capacidad para producir mediadores solubles que coordinan la respuesta inmune, entre ellos distintas citoquinas pro y anti inflamatorias que incluyen a IL-17A e IL-17F [177, 179, 180]. Así, el ciclo de vida de los neutrófilos, donde los miembros de la familia IL-17 son actores protagónicos, se perpetúa (figura 8) [175, 179].

La relación de las citoquinas IL-17A y/o IL-17F con la inmunidad adaptativa ha sido menos estudiada. Se conoce que IL-17A participa en las respuestas de linfocitos B, su producción de anticuerpos y su rol en enfermedades autoinmunes [181]. En tal sentido, se constató la formación de centros germinales espontáneos y autoanticuerpos en un modelo experimental de autoinmunidad que involucra ratones genéticamente modificados BXD, caracterizados por alta secreción de IL-17 [163, 182]. Así mismo, se reportó que el cultivo de linfocitos B humanos con IL-17 recombinante es capaz de prolongar la supervivencia y estimular la diferenciación a célula plasmática productora de anticuerpos, de manera dependiente de NF- $\kappa$ B [183]. En relación a los efectos de IL-17A sobre la respuesta adaptativa celular se publicaron algunos reportes pioneros a principios del 2000. En aquellos se observó que IL-17 es capaz de estimular la presentación antigénica induciendo la expresión de CD80, CD86, CD11c, CD40, CMH-II en las células dendríticas. Así mismo se determinó que IL-17A era importante para la activación, diferenciación y proliferación de células T (Revisado por Iwakura y col. [144]). Publicaciones posteriores aportaron evidencia interesante en relación a la influencia de la temprana producción de IL-17 sobre la subsecuente respuesta T CD4+ efectora. La producción de quemoquinas mediada por IL-17 en contexto de la infección con *Mycobacterium bovis* o vacunación con *Mycobacterium tuberculosis*, atraería células Th1 capaces de producir la cantidad de IFN- $\gamma$  óptima para hacer frente al patógeno [184, 185]. De esta manera las células innatas productoras de IL-17 promoverían una respuesta inmune adaptativa potente, más eficiente para la resolución de la infección (Revisado por Cua y Tato [160]). Uno de los trabajos más importantes en vincular IL-17 a respuestas adaptativas da cuenta que, en un modelo de colitis inducido por células T, la deficiencia de IL-17A en las células CD4+ resulta en una condición agresiva de la enfermedad. Se demostró entonces que IL-17A es capaz de proteger la mucosa intestinal a través de la inhibición del desarrollo de linfocitos Th1 en intestino. Por otro lado, modelos de melanoma e infección con *Listeria* fueron útiles para evidenciar el rol protector de citoquinas IL-17 en la promoción de respuestas CD8 específicas a través del reclutamiento de células dendríticas capaces de realizar presentación cruzada [186, 187].

Complejizando la capacidad de IL-17A de modular la inflamación, Sonneberg y col. [188] encontraron que IL-17A más que un factor patogénico/pro-inflamatorio de la inflamación intestinal, regularía las características patogénicas o protectoras de IL-22. Reportes recientes respecto de la diversidad de escenarios dentro del linaje Th17, describen que un subtipo de linfocitos Th17 que se desarrolla en

ausencia de IL-23 no interviene en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes, e incluso produce IL-10 una típica citoquina anti-inflamatoria [157]. De forma adicional, se ha demostrado que IL-17 suprime la expresión de algunas quemoquinas (por ejemplo CCL5 y CCL27) y disminuye VCAM-1, moléculas involucradas en el reclutamiento de células T, eosinófilos y basófilos [189-191]. En el mismo sentido, algunos trabajos dan cuenta de que la neutralización de IL-17 agrava la colitis inducida por dextrán-sulfato, aumenta el asma alérgico e incrementa la respuesta efectora T CD4+ en la infección con *Acanthamoeba* y HPV, entre otros [192-195].

Si bien IL-17A e IL-17F ejercen funciones biológicas similares en una amplia mayoría de los casos, probablemente dado su alta homología, también poseen algunas funciones no superpuestas o incluso opuestas. En ese sentido, se ha demostrado que la ausencia de IL-17A pero no la de IL-17F, disminuye la susceptibilidad a encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) o asma en ratones, dando cuenta del rol patológico de IL-17A en ambos procesos. Además, en un modelo de asma, animales que carecen de IL-17F pero no de IL-17A muestran una respuesta Th2 exacerbada con mayor infiltrado de eosinófilos, lo que indicaría un papel protector de IL-17F [196]. En sentido opuesto, mientras IL-17A resulta protectora en un modelo agudo de dextrán-sulfato, IL-17F resulta patogénica (revisado por Jin y Dong [197]).

### IL-17E

La producción de IL-17E fue inicialmente asociada a la población de linfocitos Th2 activados [198]. Sin embargo, con el pasar del tiempo se han reportado numerosas fuentes adicionales. Entre ellas se encuentran gran variedad de células inmunes y estromales: eosinófilos, basófilos, mastocitos, macrófagos, microglia, hepatocitos, células renales, células pulmonares, células de médula ósea, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales (revisado por Song y Qian [146]).

IL-17E actúa como homodímero por unión a un complejo receptor formado por IL-17-RA e IL-17RB. La afinidad de unión de IL-17E a IL-17RB es mayor que la que muestra IL-17B. Se ha reportado que por el hecho de competir con IL-17A e IL-17F por IL-17RA, IL-17E actúa como regulador negativo de las mismas [155]. Por otro lado IL-17E ejerce su acción preferencialmente sobre células hematopoyéticas, hecho que contrasta con la variedad de células en que IL-17A e IL-17F ejercen su efecto. La expresión de IL-17RB ha sido reportada en monocitos, células NKT, linfocitos innatos tipo 2, progenitor

multipotente tipo 2 y células mieloides productoras de citoquinas Th2. Así mismo se demostró la expresión de IL-17RB en células de la inmunidad adaptativa como linfocitos Th2 o Th9. Células no inmunes como aquellas de colon y epitelio pulmonar, también registraron respuesta a IL-17E (revisado por Valizadeh y col.[199])

De forma similar a IL-17RA, IL-17RB expresa un dominio SEFIR y requiere de Act-1 para desencadenar sus efectos biológicos [200]. Así mismo la molécula adaptadora TRAF-6 participa en su señalización y media la activación de NF- $\kappa$ B. Mecanismos independientes de TRAF-6 llevarían a la activación de MAPK como ERK, p38 y JNK. De manera adicional, se ha descrito que IL-17E es capaz de activar otras moléculas asociadas a respuestas del perfil Th2, como los factores de transcripción GATA-3 y STAT-6 e IL-4 [146, 148, 200].

Aunque en un principio se concebía a IL-17E como una molécula regulatoria, ahora se sostiene que cumple un rol de tipo inflamatorio. En este sentido se ha demostrado su asociación a respuestas alérgicas y su participación en la defensa frente a helmintos (revisado por Iwakura y col.[144]). El efecto biológico más relevante mediado por IL-17E es su capacidad para incentivar la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 por parte de las células hematopoyéticas que expresan IL-17RA [201]. También se ha descrito que IL-17E es capaz de estimular la producción de quemoquinas que atraen eosinófilos y linfocitos Th2, como IL-8, eotaxina y quemoquina derivada de los macrófagos [202]. Finalmente, está ampliamente documentado el rol de IL-17E como inductor de células innatas asociadas a un perfil de respuesta tipo 2 [146]. Por otro lado, la función de IL-17E en la inmunidad adaptativa se encuentra signada por fuerte asociación a linfocitos Th2. Se ha descrito que IL-17E es capaz de favorecer la diferenciación de linfocitos T CD4+ al perfil de respuesta tipo 2, estabilizarlo e inhibir los demás perfiles (particularmente Th17) [203]. Sobre la respuesta humoral, también se sabe que IL-17E es capaz de estimular la producción de anticuerpos y favorecer los isotipos IgG1, IgE e IgA [204, 205].

### IL-17C

A diferencia de las citoquinas IL-17A, IL-17F e IL-17E, existen relativamente pocos reportes respecto de la biología y funciones de IL-17C. Se sabe que queratinocitos, células epiteliales del tejido bronqueoalveolar y de intestino son capaces de producir IL-17C ante estímulos que, en general, involucran receptores de la familia tipo Toll u otros receptores de reconocimiento de patrones [161].

El heterodímero IL-17RA/IL-17RE actúa como receptor de IL-17C [206]. Su expresión ha sido reportada en monocitos humanos, células de exudado peritoneal de ratón y particularmente células epiteliales y linfocitos Th17 [146]. Se conoce también que, tras unir a su ligando, el complejo receptor IL-17RA/IL-17RE es capaz de inducir la activación de NF- $\kappa$ B y MAPK de manera dependiente de Act-1 [155].

Las funciones biológicas asociadas a IL-17C se asemejan a las descritas para IL-17A e IL-17F e incluyen el reclutamiento de neutrófilos, la liberación de moléculas pro-inflamatorias como TNF e IL-1 $\beta$ , la producción de moléculas antimicrobianas y la activación de ocludina que preserva la integridad de la barrera epitelial [167]. Se sostiene que IL-17C sería importante en la homeostasis de mucosas y actuaría sinérgicamente con IL-22 [206]. Su participación en procesos patológicos ha sido establecida en psoriasis, mientras se demostró cumple rol protector en colitis inducida por dextrán [207, 208]. Respecto de su acción en el sistema adaptativo, se ha descrito que promueve respuestas de tipo Th17 y la expresión de IL-17A e IL-17F [209].

#### IL-17B e IL-17D

IL-17B e IL-17D son los miembros menos caracterizados de la familia. Evidencia esporádica da cuenta de los efectos pro-inflamatorios, semejantes a IL-17A, que presentan ambas citoquinas bajo ciertas condiciones. Particularmente se sabe que ARNm de IL-17B se expresa en varios tejidos humanos (como intestino, estómago y páncreas), así como en condrocitos, neuronas y células de cáncer de mama [140, 145, 210]. IL-17B señala a través de un receptor que involucra a IL-17RB, pero la afinidad de unión es menor a la que presenta IL-17E [146, 147]. La vía de señalización de IL-17B se desconoce; sin embargo se sabe que esta citoquina induce TNF e IL-1 $\beta$  en la línea celular THP1 [142]. Así mismo, se ha descrito su asociación a modelos experimentales de artritis reumatoidea y cáncer. Por su parte IL-17D se expresa en cerebro, corazón, pulmones, páncreas, músculo esquelético y tejido adiposo. Aunque se desconoce su receptor, se ha demostrado que IL-17D induce la producción de IL-6, IL-8 y GM-CSF por parte de células endoteliales o fibroblastos de gallina, y estimula in vitro la citotoxicidad de células NK humanas (revisado Song y Qian [146] y Iwakura y col. [144]).

#### Rol de IL-17s en infecciones

A pesar de la gran cantidad de reportes que asocian a las citoquinas de la familia IL-17 con distintos desórdenes inmunitarios, como patologías autoinmunes (artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis

múltiple, enfermedad de Crohn's, entre otros) y alergia; su función fisiológica está asociada a homeostasis tisular, cumpliendo funciones en el remodelamiento óseo, la granulopoyesis y la protección de mucosas, así como en la defensa frente a infecciones (revisado por Onishi y Gaffen [211] e Iwakura y col. [144]). Consecuentemente al hecho de que muchos microorganismos inducen la producción de citoquinas IL-17, los ratones deficientes en IL-17A, IL-17F o IL-17RA han mostrado ser particularmente susceptibles a gran número de infecciones [161, 167]. Por su parte, pacientes con inmunodeficiencias en IL-17 o alguna de las moléculas asociadas a su señalización, han evidenciado ser susceptibles a infecciones con *Cándida albicans* y en menor medida *Staphylococcus aureus*, ambos patógenos oportunistas [212, 213]. En este sentido, el papel protector de las citoquinas IL-17 ha sido largamente demostrado en infecciones con bacterias extracelulares y hongos [197, 214, 215]; mientras son más recientes los reportes que destacan su importancia en la defensa frente a microorganismos intracelulares como bacterias, virus y parásitos [216]. Entre los múltiples efectos biológicos que las citoquinas IL-17 pueden gatillar, los que han sido preferencialmente explorados en infecciones, son: el reclutamiento de neutrófilos hacia sitios de infección; la producción de moléculas antimicrobianas; la capacidad de modular la inflamación con preponderante función pro-inflamatoria; y la interacción con otras poblaciones efectoras como linfocitos CD4+ Th1, células B, entre otras. Los modelos experimentales con ratones genéticamente modificados han sido frecuentemente utilizados en la gran mayoría de las investigaciones; y generalmente las mismas han avanzado sobre las funciones de IL-17A e IL-17F.

El rol protector de IL-17 ha sido descrito frente a numerosas bacterias extracelulares, entre ellas: *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter rodentium*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis* y *Helicobacter Pylori* (revisado por Onnishi y Gaffen [211]). El primer reporte que utilizó ratones deficientes en IL-17RA (IL-17RA KO), demostró que eran susceptibles a la infección pulmonar causada por la bacteria extracelular *K. pneumoniae*. Ratones IL-17RA KO infectados con *K. pneumoniae* presentaron un menor reclutamiento de neutrófilos, una mayor carga bacteriana, y una incrementada mortalidad [211]. De hecho, reportes posteriores de este grupo indicaron que IL-23 (citoquina importante para perpetuar respuestas Th17) se requiere en esta infección pulmonar para generar respuestas Th17 [217, 218]. Un dato interesante, es que IL-17A e IL-17F parecen tener efectos redundantes en esta infección, ya que los animales deficientes en las citoquinas individuales muestran

menor compromiso que los IL-17RA KO [144]. Por otro lado, estudios en modelos de infección con *C. rodentium* (un patógeno gram-negativo que causa enteropatías en ratones y se asemeja a infecciones con *Escherichia coli* en humanos) demostraron que IL-17 es importante para la producción de péptidos antimicrobianos y el reclutamiento de neutrófilos [219]. De hecho, la disminución de respuestas Th17 (gatilladas normalmente por una bacteria comensal) repercute negativamente en la infección con *C. rodentium*, aunque la participación de IL-22 parece ser mayor que el de IL-17 [220]. Experimentos con esta infección también demostraron efectos no redundantes de IL-17A e IL-17F, ya que la pérdida individual de estas citoquinas afecta a la progresión de la infección. Frente a *S. aureus* (un coco gram-positivo que afecta la piel), IL-17A e IL-17F son importantes para el reclutamiento de neutrófilos [221]. Aquí ambas citoquinas parecen superponer sus efectos, ya que mayor susceptibilidad a este patógeno se evidencia sólo en animales IL-17A/F KO. Se ha descrito adicionalmente que IL-17C se induce en la infección (aunque no se ha dilucidado su efecto) y que linfocitos T  $\gamma\delta$  que producen IL-17A son cruciales en la defensa frente a esta bacteria [159]. Respecto de la contribución de las citoquinas IL-17 en la infección con *P. gingivalis*, se ha descrito que en ausencia de IL-17RA se presenta una mayor periodontitis. El mecanismo que media la protección de IL-17RA está dado en este caso por el reclutamiento de neutrófilos [222]. Por otro lado, reportes que complejizan el rol de IL-17 frente a bacterias extracelulares, describen que la producción de IL-17A frente a *H. pylori* lleva a un mayor infiltrado de neutrófilos en la mucosa gástrica que, si bien disminuyen la carga bacteriana, también colaboran con la patología [223]. Se destaca que, tanto en esta infección como en gran parte del espectro de infecciones causadas por bacterias extracelulares, las citoquinas IL-17 intervienen en la protección de mucosas (pulmonar, intestinal, oral y gástrica), particularmente a través del reclutamiento de neutrófilos.

Respecto del papel de IL-17A frente a bacterias intracelulares, se ha descrito que ratones IL-17A KO son más susceptibles a la infección con *Francisella tularensis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella entérica* (revisado en Khader y Gopal [216]). En general, el perfil protector de IL-17 frente a las mismas también está asociado a su capacidad de estimular la respuesta de neutrófilos. Tal es el caso de la infección con *M. pneumoniae* (donde también se ha detectado IL-17C). Sin embargo, en el caso de las infecciones con *F. tularensis* y *Chlamydia muridarum*, IL-17 es importante para generar una adecuada respuesta Th1 que juega un rol central en la resistencia del

hospedador [224, 225]. Además, si bien en la infección con *L. monocytogenes* la respuesta Th1 sigue siendo considerada esencial para combatir al microorganismo invasor, IL-17 resulta crítica para el reclutamiento de neutrófilos y el desarrollo de respuestas de memoria a largo plazo [226, 227]. Mientras tanto, en la infección con *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* donde la inmunidad protectora es de claro perfil Th1 y existe un fuerte protagonismo de IL-12, IL-17A e IL-17F participan en la inflamación pero no son requeridas para la protección. Más específicamente, si bien en ausencia de IL-17RA hay menor producción de mediadores inflamatorios, estos animales no son más susceptibles a la infección que los animales control [184, 185]. Curiosamente, la bacteria intracelular *Chlamydia pneumoniae* tiene un mecanismo de evasión de la respuesta mediada por IL-17 que consiste en la liberación de una proteína que se une a Act-1 e impide la señalización de IL-17RA [228].

Se ha descrito ampliamente que varias citoquinas de la familia IL-17, en especial IL-17A e IL-17F son importantes en la defensa frente a hongos [161, 212, 229]. En tal sentido, tanto humanos como animales de experimentación (ratones) que presentan deficiencias en el eje de la IL-17A (IL-17, IL-17RA, CARD9 o Act-1) son particularmente susceptibles a la infección con *C. albicans* [230]. Este hongo comensal genera infecciones tanto locales como sistémicas, y la respuesta asociada a las mismas es sustancialmente distinta. En las infecciones sistémicas (la forma de infección más complicada de *C. albicans*), los ratones IL-17RA KO son extremadamente susceptibles. Aunque el mecanismo preciso se desconoce, se ha descrito que el reclutamiento de neutrófilos está particularmente comprometido. En el mismo sentido, en modelos de infección orofaríngea también se vieron afectados el reclutamiento de neutrófilos y la producción de un amplio rango de quemoquinas y moléculas inflamatorias [211]. Además, se ha caracterizado el papel protector de las respuestas Th17 en contexto de infecciones con otros hongos como *Aspergillus fumigatus* y *Pneumocystis carinii* (revisado por Onishi y Gaffen [211]).

Por otro lado, IL-17 participa en forma protectora o patogénica en la respuesta inmune frente a muchos virus [216]. Mientras que en algunos casos la respuesta de IL-17 resulta protectora al inducir gran cantidad de moléculas inflamatorias y quemoquinas, en otros ha resultado deletérea por demorar respuestas Th1 [211, 216]. Hace ya más de 20 años, se reportó que el Herpes virus produce una proteína análoga a IL-17A [231]. De forma interesante, se probó que la misma gatilla la señalización de IL-17RA. Por su parte, el rol de esta molécula en la infección ha sido asociado a respuestas patogénicas

que favorecen la persistencia viral [211]. De forma interesante, protocolos de vacunación para Poxvirus que combinan con Vaccinia virus con IL-17, mostraron ser incluso más protectores que los conjugados con IL-12 [232]. Así mismo, la respuesta a IL-17 ha sido asociada a la “tormenta de citoquinas” que determina la patología frente a ciertos patógenos. En ese sentido, IL-17A e IL-17F se producen tempranamente en la infección con influenza y ratones IL-17RA KO presentan menor susceptibilidad a la infección en parte por su gran influjo de neutrófilos a pulmón [233]. Así mismo, la respuesta de IL-17E frente al virus sincicial respiratorio exacerba la alergia [234]. Así como éstos, la participación de IL-17 ha sido reportada en otras infecciones como aquellas con el virus de la hepatitis B y C, el virus del dengue, el citomegalovirus, el virus de la inmunodeficiencia humana, y la lista continúa. Por ejemplo, se ha reportado que IFN tipo I inhiben a IL-17 y se está discutiendo si esto resulta en beneficio o detrimento de la respuesta antiviral [235].

En infecciones parasitarias se ha descrito el rol protector de IL-17E frente a nematodos y helmintos, como *Trichuris muris* y *Nippostrongylus brasiliensis*, probablemente en estrecha relación con la capacidad de IL-17E de incentivar respuestas tipo Th2 (revisado por Valizadeh y col. [199]). Respecto del rol de IL-17RA en la infección con *Toxoplasma gondii*, hay resultados en dos sentidos: mientras por un lado se ha reportado que las señales a través de IL-17RA son importantes para generar una respuesta de neutrófilos que combata al parásito eficientemente [236]; por otro se ha mostrado que animales C57BL/6 IL-17RA KO tienen menor susceptibilidad a la infección [237].

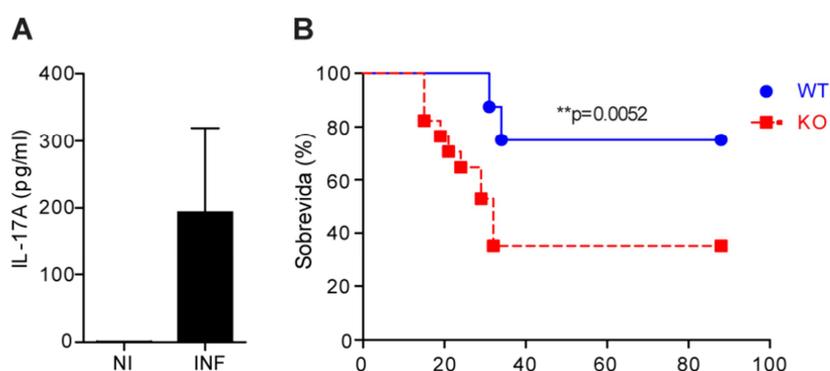
### **Antecedentes del grupo de trabajo**

La presente tesis doctoral se enmarcó en una línea de investigación orientada a evaluar el papel de la IL-17A en la progresión de la infección con *T. cruzi*. En ella se desarrollaron algunos ensayos preliminares que requirieron establecer un modelo experimental de infección, que se utilizó luego a lo largo de toda la tesis. El mismo consistió en inyectar de forma intraperitoneal 5000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén (clasificada como DTU VI) [43] a ratones C57BL/6 salvajes (WT). Es importante destacar que en ratones con un trasfondo genético C57BL/6, esta dosis y cepa de parásitos genera una infección aguda, caracterizada por parasitemias moderadas (con un pico de parasitemia alrededor del día 20 post-infección o pi) y una potente respuesta inflamatoria. Esta última permite, tanto el control de los niveles de parásitos circulantes (que se tornan indetectables alrededor día 30 pi), como la sobrevida y la progresión a fase indeterminada y/o crónica de un gran porcentaje de ratones

infectados. Un primer experimento consistió en determinar los niveles de IL-17A e IL-17F presentes en animales infectados según el modelo descrito. De esta forma las concentraciones plasmáticas de IL-17A e IL-17F fueron evaluadas por la metodología de ELISA, en plasma de animales WT sacrificados a distintos tiempos de infección. La concentración plasmática de IL-17A puede cuantificarse sólo durante un corto período de tiempo alrededor del día 20 pi, mientras que no se detectó IL-17F a ningún tiempo de infección estudiado (figura 9A y datos no mostrados).

Con el objetivo de estudiar la participación de citoquinas IL-17 en la progresión a la infección con *T. cruzi*, se compararon las tasas de mortalidad de ratones WT con las de ratones del mismo origen genético (C57BL/6) pero deficientes en el receptor A de IL-17 (IL-17RA KO). Sin expresión de IL-17RA, se interrumpe la señalización de todas las citoquinas que utilizan ese receptor, es decir de al menos IL-17A, IL-17C, IL-17E e IL-17F. Utilizar estos animales brinda la posibilidad de evidenciar fenómenos que, en ausencia de efectos compensatorios entre los distintos miembros de esta familia, se presentan de forma pronunciada; sin embargo, trabajar con estos ratones no permite discriminar efectos individuales o combinados de algunas de ellas. Teniendo en cuenta estas consideraciones, ratones WT e IL-17RA KO fueron infectados según el modelo descrito, y se determinó el porcentaje de mortalidad como indicador de la susceptibilidad. Como puede observarse en la figura 9B, los animales WT comenzaron a sucumbir hacia el día 32 pi con *T. cruzi*, mientras que los ratones IL-17RA KO presentaron una mortalidad más

temprana, que se inició próxima al día 15 pi. Asimismo, se observó que a lo largo de todo el periodo de infección evaluado (hasta el día 90 pi), el grupo de ratones IL-17RA KO exhibió mayor mortalidad que su contraparte WT (en frecuencias próximas al 66% y 33%, respectivamente). En combinación, estos datos permiten afirmar que la ausencia de expresión de IL-17RA



**Figura 9: Ratones IL-17RA KO son más susceptibles a la infección con *T. cruzi*.** **A)** Concentración de IL-17A en plasma de ratones no infectados (NI) o a los 20 días pi con *T. cruzi* (I). En cada barra se grafica el promedio  $\pm$  DE de 5 ratones por grupo. **B)** Sobrevida de ratones WT (azul) e IL-17RA KO (rojo) infectados con *T. cruzi*. Se ensayaron 12 animales por grupo y los resultados se analizaron con test Gehan-Brelow-Wilcoxon. Los resultados en **A** y **B** son representativos de dos experimentos independientes.

incrementa la susceptibilidad frente a la infección experimental con *T. cruzi*.

A estos resultados iniciales que sustentaban esta tesis, se sumaron los reportes de dos grupos independientes que demostraron que IL-17A se induce durante la infección experimental con *T. cruzi* y que la misma está involucrada en la resistencia del hospedador frente al parásito [238, 239]. Ambos trabajos describieron también un rol protector de IL-17A en la infección, sin embargo, mostraron entre sí marcadas diferencias respecto de los mecanismos protectores involucrados, pobremente estudiados. Esta disparidad de resultados puede explicarse en relación a importantes diferencias en las aproximaciones experimentales que incluyen: diferentes cepas de ratones (Balb/c y C57BL/6) y parásitos (cepa Y y Tulahuén), así como diferentes modos de bloquear el efecto de IL-17 (bloqueo con anticuerpos neutralizantes y delección génica). En cualquier caso, estas discrepancias motivaban una evaluación más precisa del papel de esta familia de citoquinas en esta infección parasitaria, que abordara los diferentes mecanismos protectores gatillados, así como posibles papeles redundantes entre los distintos miembros de la familia IL-17 [238, 239].

# OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

## **Objetivo General**

Estudiar la participación de las citoquinas de la familia de IL-17 en la respuesta inmune frente a *T. cruzi*, focalizando el análisis en el efecto de estas citoquinas en el desarrollo de las respuestas efectora inflamatoria, regulatoria y específica.

## **Objetivos Específicos**

- 1) Evaluar el papel de las citoquinas de la familia de IL-17 en la progresión de la infección experimental con *T. cruzi*.
- 2) Estudiar el papel de la señalización a través de IL-17RA en la respuesta inmune innata y la regulación de la inflamación durante la infección con *T. cruzi*.
- 3) Estudiar el papel de citoquinas IL-17 en el desarrollo de una respuesta adaptativa antiparasitaria protectora durante la infección con *T. cruzi*.

## **Hipótesis**

La familia de citoquinas IL-17 está compuesta por seis miembros de distinto origen celular, con patrones de expresión disímiles y efectos biológicos característicos, que a menudo se superponen. A pesar de que gran cantidad de investigaciones resaltan el papel patogénico de IL-17A en enfermedades autoinmunes, tanto esta como las otras citoquinas de la familia de IL-17 cumplen funciones importantes en la resistencia a infecciones. Resultados previos de este y otros grupos de investigación evidenciaron que IL-17A se produce en la infección con *T. cruzi* y juega un papel importante en la resistencia frente al parásito. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales esta citoquina ejerce sus efectos y la participación de los otros miembros de la familia IL-17 no han sido completamente establecidos. En este contexto la hipótesis que se sostiene en este trabajo de tesis es que IL-17RA y las citoquinas IL-17 que por él señalizan cumplen funciones protectoras en la infección con *T. cruzi*, asociadas a la modulación de la inmunidad innata, la inflamación y la respuesta inmune adaptativa antiparasitaria.

# RESULTADOS

## RESULTADOS I

Estudio de la producción de citoquinas de la familia IL-17 durante la infección con *T. cruzi* y su papel en la resistencia a la infección

## RESULTADOS II

Estudio del papel de la señalización a través de IL-17RA en la respuesta inmune innata y la regulación de la inflamación durante la infección con *T. cruzi*

## RESULTADOS III

Estudio del papel de citoquinas IL-17 en el desarrollo de una respuesta citotóxica específica durante la infección con *T. cruzi*

# RESULTADOS I

## Estudio de la producción de citoquinas de la familia IL-17 durante la infección con *T. cruzi* y su papel en la resistencia a la infección

Las citoquinas IL-17A, IL-17E e IL-17F se producen en respuesta a la infección con *T. cruzi*

La señalización vía IL-17RA participa en el control del parasitismo tisular en la infección con *T. cruzi*

La susceptibilidad de los ratones IL-17RA KO a la infección con *T. cruzi* correlaciona con mayor daño hepático

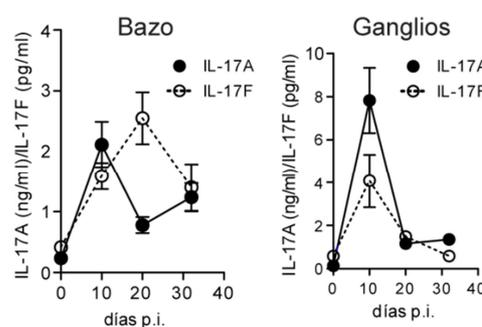
La susceptibilidad de los ratones IL-17RA KO a la infección con *T. cruzi* es consecuencia de una incrementada inflamación

Conclusiones

### Las citoquinas IL-17A, IL-17E e IL-17F se producen en respuesta a la infección con *T. cruzi*

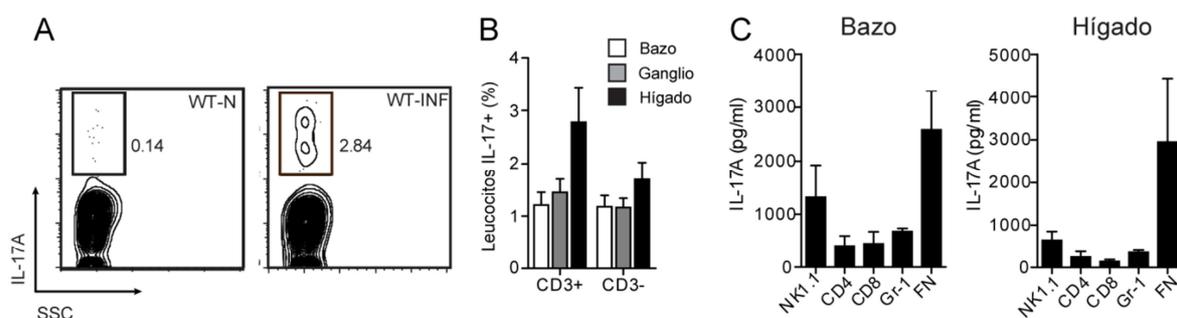
Con el objetivo profundizar la caracterización de las citoquinas de la familia IL-17 en la respuesta inmunitaria frente a *T. cruzi*, se estudió la cinética de producción de IL-17A e IL-17F durante la infección, y las poblaciones involucradas en la liberación de IL-17A. En primer lugar, se cuantificaron las concentraciones de IL-17A e IL-17F producidas por células de bazo y ganglios subcutáneos (ganglios) de animales WT a distintos tiempos de infección (día 0, 10, 20 y 32 pi). Se destaca que muchos de los ensayos realizados a lo largo de esta tesis se focalizaron en los ganglios y, principalmente, en el bazo como órganos linfoides centinelas de la respuesta inmunitaria sistémica contra *T. cruzi*. Entonces, las suspensiones celulares de bazo y ganglios de animales a distintos tiempos de infección fueron cultivadas durante 48 horas (h) en ausencia de estímulo o en presencia de anticuerpos anti-CD3 y el mitógeno forbol 12,13-dibutirato (anti-CD3/PdBU). Luego, las concentraciones de IL-17A e IL-17F en los sobrenadantes de estos cultivos fueron determinadas por la metodología de CBA (del inglés *Cytometric Bead Array*). Mientras ambas citoquinas fueron indetectables en ausencia de estímulo (datos no mostrados), frente al estímulo mitogénico las concentraciones de IL-17A e IL-17F acompañaron la cinética de parasitemia: registraron un incremento a los días 10 y 20 pi, y retornaron a valores basales alrededor del día 32 pi (figura 10). Es importante destacar que, de manera coherente a los hallazgos en plasma donde sólo se detectó IL-17A, las concentraciones de IL-17F aquí cuantificadas fueron cerca de 1000 veces menores que las de IL-17A.

A continuación, se evaluaron las poblaciones productoras de IL-17A en la infección. Estos análisis se circunscribieron a IL-17A porque las bajas cantidades de IL-17F dificultaron su caracterización a este nivel. Así, las suspensiones celulares de bazo, ganglio e hígado provenientes de animales WT infectados (día 20 pi) y no infectados como control, fueron cultivadas durante 5 h con el estímulo mitogénico forbol 12-



**Figura 10. La infección con *T. cruzi* induce la producción de IL-17A e IL-17F.** Concentraciones de IL-17A e IL-17F en sobrenadantes de cultivo de suspensiones celulares de bazo (izquierda) y ganglios (derecha) obtenidas de ratones WT infectados sacrificados a distintos tiempos de infección con *T. cruzi* y estimuladas durante 48 h en presencia de anti-CD3/PdBU. Cada punto es el promedio  $\pm$  DE de 5 ratones por grupo. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

miristato-13-acetato/Ionomicina (PMA/Ionomicina) e inhibidores del transporte vesicular. Luego, las células fueron marcadas en superficie e intracelularmente para identificar a LiT e IL-17, y analizadas finalmente en el citómetro de flujo. Los resultados en la figura 11A y otros no mostrados, evidenciaron la existencia de leucocitos IL-17+ en todos los órganos evaluados y particularmente en el hígado, órgano diana de la infección aguda con el parásito. Además, la caracterización fenotípica de estas células reveló que tanto los linfocitos T o LiT (células CD3+) como otros leucocitos (células CD3-) produjeron IL-17A (figura 11B). Con propósito de precisar la capacidad de distintas poblaciones celulares de producir IL-17, se realizaron cultivos de células purificadas por *cell sorting*. Entonces, las suspensiones celulares de bazo e hígado de ratones WT a los 20 días pi, fueron separadas según la expresión de marcadores poblacionales en: LiT CD4+ (CD3+CD4+); LiT CD8+ (CD3+CD8+); células NK (CD3-NK1.1+); células Gr1+ (mayoritariamente neutrófilos; Gr1+); y la fracción negativa o FN (CD3-NK1.1-). Posteriormente, las células fueron cultivadas durante 48 h en presencia de distintos estímulos: Específicamente los LiT fueron estimulados con anti-CD3/PdBU; mientras que el resto de las células se cultivaron con bajas dosis de PMA/Ionomicina. Finalmente, las concentraciones de IL-17A fueron determinadas en los sobrenadantes de cultivo por la técnica de ELISA. Como puede observarse en la figura 11C, todos los tipos celulares ensayados produjeron esta citoquina; sin embargo, sobrenadantes



**Figura 11. Distintas poblaciones celulares producen IL-17A durante la infección con *T. cruzi*.** **A)** Porcentaje de células IL-17A+ en suspensiones celulares de hígado de animales no infectados (WT-NI) o al día 20 pi con *T. cruzi* (WT-INF) cultivadas durante 5 h con PMA/Ionomicina y brefeldina A. Cada uno de los gráficos es representativo de 5 ratones. **B)** Porcentaje de leucocitos IL-17+ en las poblaciones celulares CD3+ y CD3- de bazo, ganglios e hígado de ratones infectados luego del estímulo descrito en A. Los resultados muestran el valor promedio de 5 ratones por grupo  $\pm$  DE. **C)** Concentración de IL-17A en sobrenadante de cultivo de 48h de células NK1.1+, LiT CD4+ y CD8+, células Gr-1+ y células remanentes en la fracción negativa (FN) purificadas de bazo (izquierda) e hígado (derecha) de ratones al día 20 pi. Células NK1.1+, Gr-1+ y de la FN se cultivaron en presencia de bajas concentraciones de PMA/Ionomicina mientras que LiT se estimularon con anti-CD3/PdBU. Los resultados se muestran el promedio de triplicados de cultivo  $\pm$  DE. Los resultados de A-B y C son representativos de tres y dos experimentos independientes, respectivamente.

de linfocitos NK y, sobre todo de células de la fracción negativa mostraron las concentraciones más altas

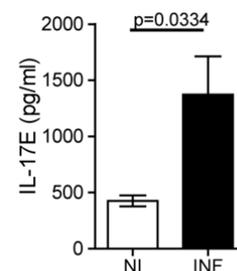
En el marco de investigaciones que estudiaban la participación de otras citoquinas IL-17 en la respuesta inmunitaria frente a patógenos [146] y de reportes que describían que IL-17C e IL-17E también señalizan a través de IL-17RA [148], se propuso evaluar la producción de estas citoquinas en la infección con *T. cruzi*. Debido a que reactivos comerciales para la cuantificación de IL-17C no estaban disponibles cuando estos experimentos se diseñaron, la determinación de la misma no pudo efectuarse. Por su parte IL-17E se cuantificó en plasma de ratones WT no infectados o al día 20 pi, a través de la técnica de ELISA. A

diferencia de IL-17A e IL-17F, los animales no infectados presentan niveles basales de IL-17E en plasma. Más aún, al día 20 pi la cantidad de IL-17E se incrementó más de dos veces respecto de los controles no infectados, indicando la infección induce la producción de esta citoquina (figura 12).

En conjunto estos resultados demostraron que las citoquinas IL-17A, IL-17E e IL-17F se producen en la infección con *T. cruzi*, que diferentes poblaciones celulares están comprometidas en ese fenómeno (al menos para el caso de IL-17A), y que su máxima concentración se alcanza en momentos donde la parasitemia es también mayor.

### **La señalización vía IL-17RA participa en el control del parasitismo tisular durante la infección con *T. cruzi***

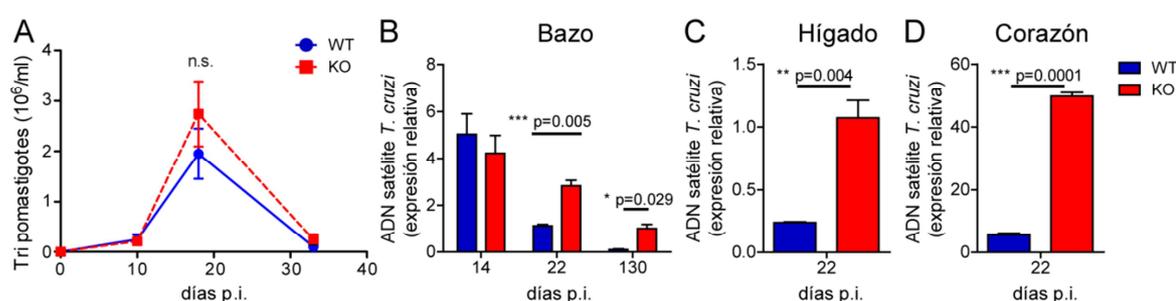
Los resultados previos que fundamentan este trabajo de tesis, descritos en la introducción, indicaron que ratones que carecen del IL-17RA son más susceptibles a la infección con *T. cruzi* que los ratones WT. Tomando en consideración que la progresión a la infección y la supervivencia de animales frente a muchos patógenos se dirime entre la capacidad de limitar la replicación del microorganismo y la de controlar el daño de órganos vitales por inflamación [58]; se propuso evaluar la carga parasitaria en tejido, el daño tisular y la inflamación presentes en los ratones IL-17RA KO respecto de la de los WT.



**Figura 12. La concentración de IL-17E aumenta con la infección con *T. cruzi*.** Concentraciones plasmáticas de IL-17E de ratones no infectados (NI) o a los 20 días de infección con *T. cruzi* (I). Los resultados se muestran como el promedio de 5 ratones por grupo  $\pm$  DE y son representativos de de dos experimentos independientes. El valor de p fue calculado con test-T de dos colas.

En primer lugar se evaluó la parasitemia en sangre de animales WT e IL-17RA KO a los 10, 18 y 33 días pi. Acorde con el modelo de infección descrito, los ratones WT mostraron un perfil cinético de parasitemia caracterizado por una incipiente cantidad de parásitos en sangre en proximidad del día 10 pi, un pico marcado en cercanías al día 20 pi y un control prácticamente total de los mismos alrededor de los 30-35 días pi. Por su parte los ratones IL-17RA KO presentaron una cinética de parasitemia y magnitudes semejantes a las de ratones WT (figura 13A).

Posteriormente, se realizaron estudios de parasitismo en bazo, hígado y corazón de animales WT e IL-17RA KO a distintos tiempos de infección. El ADN total de las distintas muestras fue extraído con TRIzol y las cantidades de parásito allí presentes fueron determinadas en base a un método publicado por Pirón y col. [240]. Así, se cuantificó ADN satélite de *T. cruzi* por PCR en tiempo real y se lo relativizó a la cantidad del gen constitutivo GAPDH (enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa). Como se muestra en la figura 13B, a tiempos tempranos de infección (día 14 pi), la cantidad de ADN parasitario en bazo de animales IL-17RA KO fue similar a la de su contraparte WT. Después de alcanzar su máximo al día 14 pi, el parasitismo tisular disminuyó en ambas cepas. Sin embargo a partir del día 22 y hasta el día 130 pi los ratones IL-17RA KO presentaron mayor cantidad de parásito en tejido respecto de sus controles WT. En base a que el defecto de los ratones IL-17RA KO para controlar la carga parasitaria se manifestó a partir del día 22 pi, se eligió ese tiempo para la cuantificar el parasitismo en otros órganos como hígado y corazón, donde se encontró que los ratones IL-17RA KO presentan mayor carga



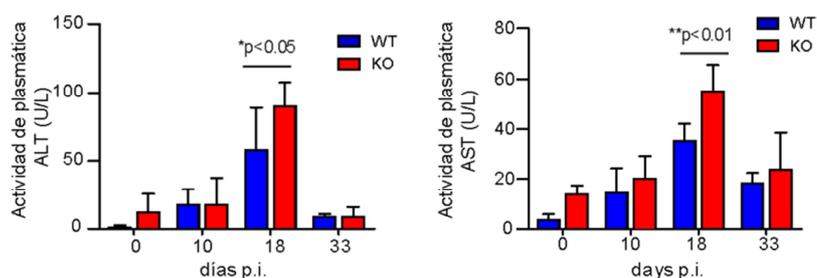
**Figura 13. Los ratones IL-17RA KO infectados con *T. cruzi* presentan incrementado parasitismo tisular.** Parasitemia **A)** y cantidad relativa de ADN satélite de *T. cruzi* en **B)** bazo, **C)** hígado y **D)** corazón de ratones WT (azul) e IL-17RA KO (rojo) a **A-B)** diferentes tiempos de infección o **C-D)** al día 22 pi. En la cuantificación del parasitismo tisular, las cantidades de ADN fueron normalizadas a GAPDH murina. Los datos se muestran como el valor promedio de 5 ratones  $\pm$  DE. Los valores de p fueron calculados con test-T de dos colas. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

parasitaria que los WT (figura 13C, D).

En resumen, si bien los animales IL-17RA KO infectados con *T. cruzi* lograron controlar la parasitemia y el parasitismo tisular temprano de manera semejante a sus controles WT, a tiempos posteriores fueron menos eficientes en reducir la carga parasitaria tisular. Las diferencias observadas entre los grupos experimentales, sugieren que la señalización a través de IL-17RA podría ser necesaria para el desarrollo/mantenimiento de algún componente del sistema inmune involucrado de manera crítica en el control del parásito en los tejidos y que se desarrolla con una cinética relativamente demorada en la infección con *T. cruzi*.

### La susceptibilidad de los ratones IL-17RA KO a la infección con *T. cruzi* correlaciona con mayor daño hepático

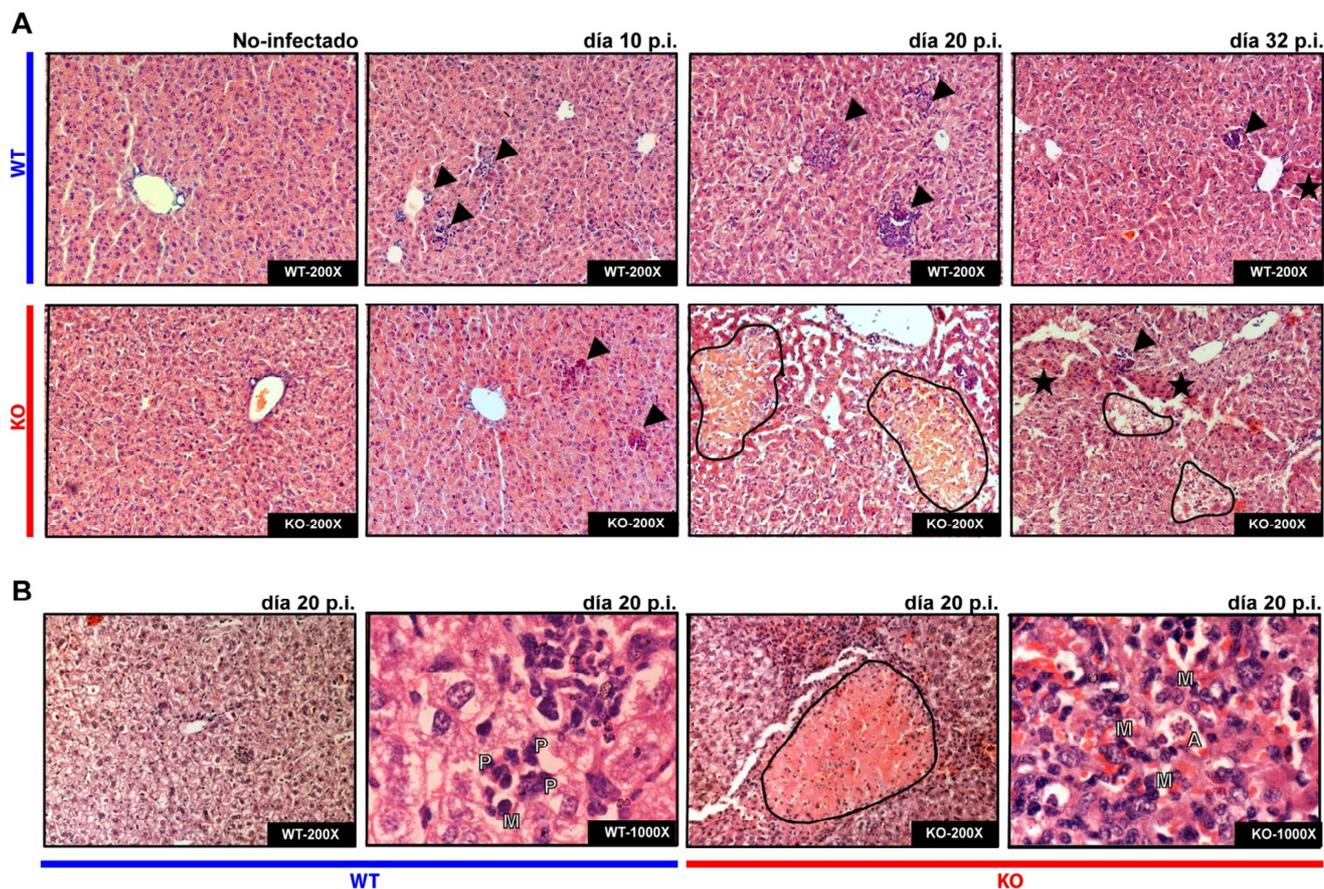
Como se mencionó anteriormente, el daño tisular provocado por la inflamación en la infección aguda con *T. cruzi*, es otro de los factores que determina la susceptibilidad a la patología. En relación a ello, se ha descrito que el hígado es un órgano particularmente sensible a este tipo de afección [113]. Se propuso entonces estudiar el daño hepático de ratones WT e IL-17RA KO infectados, utilizando animales no infectados como control. En primer lugar, se cuantificó la actividad plasmática de las transaminasas alanina aminotransferasa (ALT, de sus siglas en inglés *alanine transaminase*), y aspartato aminotransferasa (AST, de sus siglas en inglés *aspartate transaminase*) (figura 14). De forma previsible, en los animales infectados la actividad de ambas enzimas se incrementó significativamente respecto de sus contrapartes no infectadas. Sin embargo, el impacto de la infección entre ambos grupos experimentales no fue



**Figura 14. La ausencia de IL-17RA determina un aumento de la actividad de transaminasas hepáticas durante la infección con *T. cruzi*.** Concentraciones plasmáticas de ALT (izquierda) y AST (derecha) en ratones WT (azul) e IL-17RA KO (rojo) a distintos tiempos de infección con *T. cruzi*. Se grafica el promedio de 5 ratones  $\pm$  DE por grupo. Los valores de p fueron calculados utilizando ANOVA de dos vías seguido por el test de Bonferroni. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

homogéneo: Los ratones IL-17RA-KO infectados presentaron mayor actividad de ambas enzimas que sus homólogos WT. Estos resultados sugirieron que durante la infección parasitaria la ausencia de IL-17RA tiene como consecuencia un mayor daño hepático.

Con el objetivo de explorar en profundidad la fisiopatología del daño tisular, se realizaron estudios histológicos. Específicamente, cortes de hígados de animales WT e IL-17RA KO sin infectar o a los 10, 18 y 32 días pi, fueron teñidos con hematoxilina/eosina y analizados al microscopio óptico (figuras 15A, B). Los resultados aquí obtenidos fueron coherentes con los de las transaminasas hepáticas: la infección afectó la integridad de los tejidos de todos los animales, sin embargo el compromiso de los ratones IL-17RA KO fue mayor que el de los WT. En ambas cepas los animales infectados mostraron un infiltrado celular prominente desde tiempos tempranos (día 10 pi), que se pronunció en proximidades al pico de parasitemia (día 18 pi), y disminuyó posteriormente (día 32 pi). Las alteraciones histológicas más importantes causadas por la infección como necrosis y degeneración hialina se evidenciaron durante el pico de parasitemia (alrededor del día 20 pi) y se mantuvieron a tiempos posteriores. En términos generales la estructura hepática no fue severamente afectada por el proceso infeccioso; sin embargo, los hepatocitos de ratones infectados presentaron diversas anormalidades: forma hinchada y redondeada, citoplasma vacuolar y núcleos picnóticos. En simultáneo, la infección repercutió en una mayor hiperplasia de las células de Kupffer. Por otro lado y de particular relevancia para este trabajo de tesis, se evidenciaron importantes diferencias entre animales WT e IL-17RA infectados: Durante todo el tiempo de estudio y a nivel de todos los parámetros evaluados, especialmente la necrosis y la degeneración hialina, los ratones IL-17RA KO infectados mostraron lesiones más graves que sus homólogos WT (figura 15 y Tabla I). Además, el tipo celular predominante en los infiltrados inflamatorios fue también claramente diferente: mientras los animales WT presentaron un infiltrado de células polimorfonucleares, los IL-17RA KO exhibieron un infiltrado de células mononucleares (de monocitos y/o linfocitos) (figura 15B y Tabla I). En síntesis, del análisis histológico se desprende que en la infección aguda con *T. cruzi* la efectiva señalización a través de IL-17RA afecta el infiltrado celular en los tejidos y atenúa el daño hepático.



**Figura 15.** La ausencia de señalización de las citoquinas IL-17 en la infección con *T. cruzi* provoca mayor daño tisular y cambios a nivel del infiltrado inflamatorio. Fotografías de cortes histológicos de hígado de ratones WT e IL-17RA KO no infectados y luego de **A)** 10, 20 y 32 días o **B)** 20 días de infección con *T. cruzi*, teñidos con hematoxilina/eosina. **A, B)** Las Microfotografías 200X permiten la evaluación panorámica de las lesiones. Las áreas demarcadas se corresponden a zonas de extensa necrosis, las estrellas señalan regiones con degeneración hialina y las puntas de flecha advierten la presencia de focos de infiltrado inflamatorio. **B)** Las microfotografías 1000X evidencian detalles respecto de las alteraciones celulares y la naturaleza del infiltrado inflamatorio (P: células polimorfonucleares, M: células mononucleares, A: nidos de parásito en su forma amastigote). En todos los caso se muestra un fotografía representativas de 5 ratones y de dos experimentos independientes. El análisis de las mismas se sintetiza en la **Tabla I**.

**Tabla I.** Estudio cinético de lesiones hepáticas en ratones WT e IL-17RA KO

Grupo (n=5)	Días pi	Infiltrado inflamatorio <sup>a</sup> (principales tipos celulares) <sup>b</sup>	Necrosis <sup>a</sup>	Lesiones celulares <sup>a</sup>
WT	10	+++ (PMN)	+	+
	18	++++ (PMN)	+	++
	32	+++ (PMN)	+	++
KO	10	++ (Mo/Li)	+	++
	18	+++ (Mo/Li)	++/+++	+++
	32	++ (Mo/Li)	++/+++	+++

<sup>a</sup>Escala: +: leve; ++:moderada; +++: severa; ++++: extremadamente severa

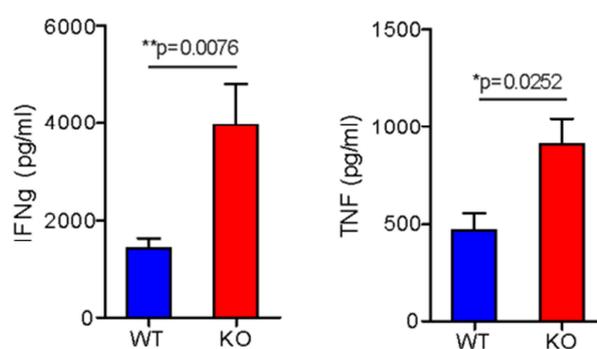
<sup>b</sup>PMN: Neutrófilos; Mo/Li: monocitos/linfocitos

### La susceptibilidad de los ratones IL-17RA KO a la infección con *T. cruzi* es consecuencia de una incrementada inflamación

Durante la infección con *T. cruzi*, la inadecuada regulación de la respuesta inflamatoria, particularmente de IFN- $\gamma$ , puede contribuir al daño tisular y a la incrementada mortalidad [110, 112, 114]. En tal sentido, se diseñaron experimentos encaminados a comparar el estado inflamatorio de ratones WT e IL-17RA KO frente al parásito y estudiar el rol potencialmente deletéreo de IFN- $\gamma$  en este contexto.

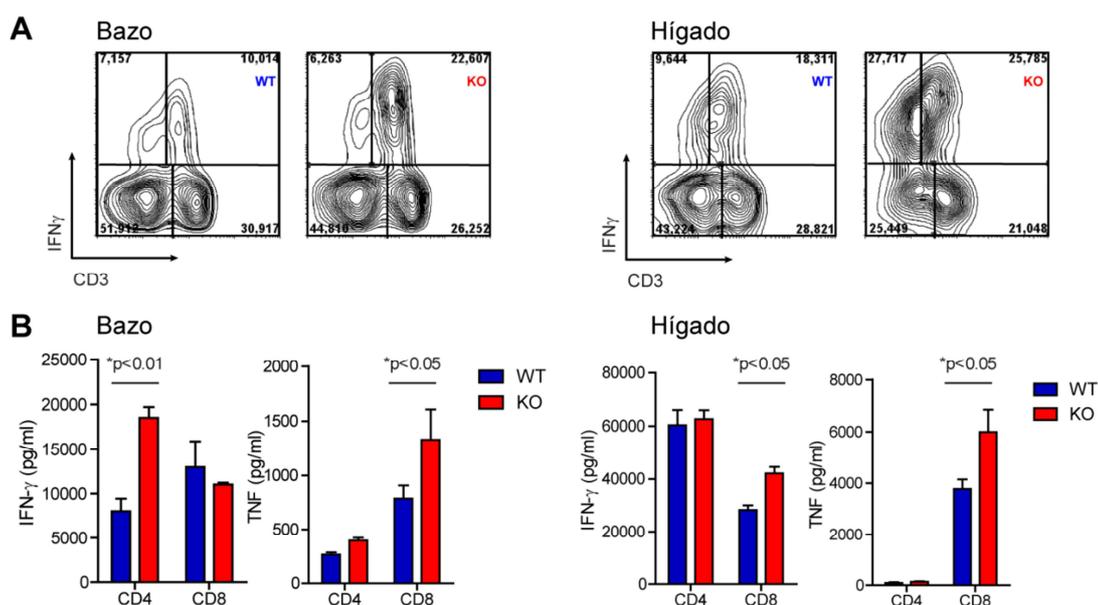
En primer lugar se determinaron por ELISA las concentraciones sistémicas de las citoquinas proinflamatorias IFN- $\gamma$  y TNF en ratones IL-17RA KO y WT a los 20 días de infección. Como era esperable, en relación al importante papel que cumple IFN- $\gamma$  en el control parasitario, todos los animales presentaron elevadas cantidades de las dos citoquinas. Sin embargo, las concentraciones TNF y particularmente de IFN- $\gamma$  fueron notablemente mayores en los animales IL-17RA KO (figura 16). Estos resultados sugirieron que la ausencia de IL-17RA en la infección con *T. cruzi* desencadena una exacerbada inflamación que podría determinar la mayor y temprana mortalidad a la infección.

Posteriormente, se estudió por citometría de flujo la frecuencia de células productoras de IFN- $\gamma$ , particularmente LiT (población celular clave en la producción de citoquinas). Suspensiones celulares de bazo e hígado de los ratones WT e IL-17RA KO al día 20 pi fueron cultivadas 5 h en presencia PMA/Ionomicina y brefeldina, luego marcadas con anti-CD3 y anti-IFN- $\gamma$ , y finalmente adquiridas en el citómetro de flujo. Como se observa en la figura 17A, tanto el bazo como el hígado de los ratones IL-17RA KO infectados presentaron un mayor porcentaje de LiT productores IFN- $\gamma$  respecto a sus homólogos WT. Además, los hígados de los animales IL-17RA KO



**Figura 16. Los ratones IL-17RA KO infectados con *T. cruzi* presentan altas concentraciones de IFN- $\gamma$  y TNF.** Concentraciones de IFN- $\gamma$  (izquierda) y TNF (derecha) en plasma de animales WT (azul) e IL-17RA KO (rojo) al día 20 pi con *T. cruzi*. Los datos se grafican como el promedio de valores obtenidos en 5 animales  $\pm$  DE y son representativos de cuatro experimentos independientes. Los valores de p se calcularon utilizando tets-T de dos colas.

también mostraron incrementada frecuencia de células CD3- productoras de IFN- $\gamma$ . Con el objetivo de profundizar estos estudios, se evaluó la producción de IFN- $\gamma$  y TNF que presentaron las subpoblaciones de LiT de animales WT e IL-17RA KO infectados. Así, los LiT CD4+ (CD3+CD4+) y LiT CD8+ (CD3+CD8+) de bazo e hígado de animales de ambas cepas al día 20 pi fueron separados por *cell sorting*; y luego cultivados 48 h en presencia del estímulo policlonal anti-CD3/PdBU. Posteriormente las concentraciones de IFN- $\gamma$  y TNF fueron determinadas en los sobrenadantes de cultivo por la técnica de ELISA (figura 17B). Los resultados de estos ensayos evidenciaron que los LiT CD4+ de bazo y los LiT CD8+ de hígado provenientes de los animales IL-17RA KO producen mayor cantidad de IFN- $\gamma$  que en los de origen WT. Además, los LiT CD8+ de bazo e hígado de animales IL-17RA KO también evidencian mayor producción de TNF que sus homólogos WT.



**Figura 17. En ausencia de IL-17RA los ratones infectados con *T. cruzi* muestran elevada producción de IFN- $\gamma$  en tejidos.**

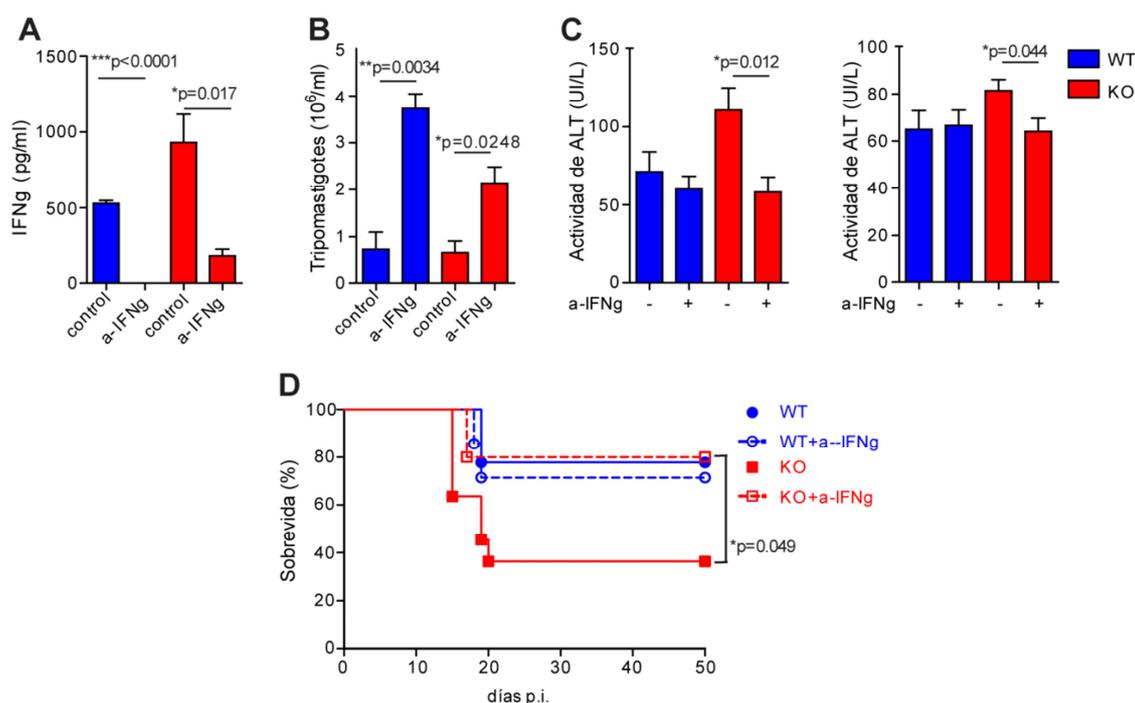
**A)** Expresión de CD3 y de IFN- $\gamma$  en células de bazo e hígado obtenidas de ratones WT e IL-17RA KO a los 20 días infección con *T. cruzi*, luego de 5 h de estímulo con PMA/Ionomicina y brefeldina. Se muestra un gráfico representativo de cinco ratones. **B)** Concentración de IFN- $\gamma$  y TNF en sobrenadante de cultivos de LiT CD4+ y LiT CD8+ purificadas de bazo (izquierda) e hígado (derecha) provenientes de animales WT (azul) e IL-17RA KO (rojo) después de 20 días de infección con *T. cruzi* y estimuladas 48 h con anti-CD3/PdBU. Los datos se muestran como el valor promedio de triplicados de cultivo  $\pm$  DE. Los valores de p fueron calculados con test-T de dos colas. Los resultados en **A** y **B** son representativos de tres experimentos independientes.

Considerando que en la infección con *T. cruzi* los ratones IL-17RA KO mostraron una incrementada y temprana mortalidad y un mayor daño hepático e inflamación que los animales WT, se especuló que las altas concentraciones de IFN- $\gamma$  de los animales IL-17RA KO podrían actuar en detrimento de su estado general y desencadenar su muerte. Para probar esta hipótesis, se aplicó un tratamiento bloqueante de IFN- $\gamma$  en ratones infectados y se estudió su efecto sobre la parasitemia, el daño tisular y la sobrevida a la infección. Ratones WT e IL-17RA KO fueron tratados con anticuerpos monoclonales neutralizantes de IFN- $\gamma$  o anticuerpos control, a los días 9, 12, 15 y 18 pi con *T. cruzi*. El esquema de inyección utilizado tuvo como objetivo atenuar la respuesta inflamatoria de ratones IL-17RA KO infectados antes que los mismos comenzaran a morir por la infección, y a la vez permitir la respuesta de IFN- $\gamma$  a tiempos tempranos de infección, necesaria para contener la replicación inicial del parásito.

En primer lugar, se corroboró la eficiencia del esquema de neutralización cuantificando por ELISA la concentración plasmática de IFN- $\gamma$  que presentaron todos los animales al día 20 pi (dos días después de la última inyección del anticuerpo neutralizante). Como puede observarse en la figura 18A, el tratamiento con anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  redujo significativamente la concentración de esta citoquina en ambas cepas de animales, indicando el éxito del tratamiento.

Se evaluó luego en los distintos grupos de animales infectados (día 20 pi): la cantidad de parásitos circulantes en sangre (figura 18B); la actividad de transaminasas hepáticas en plasma (figura 18C); y las lesiones histopatológicas en hígado (Tabla II). De manera consecuente a la conocida participación de IFN- $\gamma$  en la eliminación de *T. cruzi*, el anticuerpo neutralizante produjo un incremento de la parasitemia en animales de ambas cepas. En contraste, el efecto del tratamiento sobre los parámetros asociados a mayor afección hepática, fue diferente entre ratones WT e IL-17RA KO: Mientras no hubo diferencias entre animales WT infectados tratados con anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  y los inyectados con anticuerpo control; los ratones IL-17RA KO infectados a los cuales se les neutralizó IFN- $\gamma$ , presentaron actividades de transaminasas hepáticas y lesiones hepáticas significativamente disminuidas respecto de aquellos que recibieron el anticuerpo control (figura 18C y Tabla 2). Finalmente, estudios de sobrevida a la infección mostraron que el tratamiento anti-IFN- $\gamma$  no afectó la mortalidad de los ratones WT infectados, pero si disminuyó significativamente la de los ratones IL-17RA KO a niveles comparables con el grupo control WT (figura 18D). Es interesante destacar que, a pesar de que el anticuerpo neutralizante de IFN- $\gamma$  aumentó la parasitemia de forma significativa en ambas cepas de animales

infectados, no incrementó la mortalidad a la infección; sin embargo se desconoce cómo este fenómeno repercute en la patología chagásica. Algunos indicios son aportados por los estudios histológicos que evidencian mayor necrosis en hígados de animales WT a los que se le neutralizó IFN- $\gamma$  respecto de sus controles. Sin embargo, las consecuencias a largo plazo de la mayor parasitemia secundaria al tratamiento ameritan una evaluación más profunda. En lo que aquí respecta, los resultados del tratamiento con anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  indicaron que la incrementada susceptibilidad a la infección aguda que se manifiesta en ausencia de IL-17RA, está mediada por las altas concentraciones de IFN- $\gamma$ . Se infiere entonces que las señales gatilladas por citoquinas IL-17 son necesarias para regular la respuesta inflamatoria durante la infección con *T. cruzi*.



**Figura 18. La neutralización de IFN- $\gamma$  en ratones IL-17RA KO infectados con *T. cruzi* disminuye el daño hepático y la mortalidad.** Ratones WT (azul) e IL-17RA KO (rojo) infectados con *T. cruzi* fueron tratados con anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  (a IFN $\gamma$ ) o con anticuerpos control. Al día 20 pi se determinó **A**) la concentración plasmática de IFN- $\gamma$ , **B**) la parasitemia y **C**) la actividad de transaminasas hepáticas en plasma. Los datos se muestran el promedio  $\pm$  DE de los resultados obtenidos en 6 ratones. Los valores de p se calcularon con Test-T de dos colas. **D**) Sobrevida a la infección (n= 12 animales/grupo). Los resultados se analizaron con el test Gehan-Brelow-Wilcoxon. Los resultados mostrados en A-D son representativos de dos experimentos independientes.

**Tabla II.** Lesiones hepáticas en ratones WT e IL-17RA KO tratados o no con anti-IFN- $\gamma$  al día 20 pi

Grupo (n=5)	Infiltrado inflamatorio <sup>a</sup> (principales tipos celulares) <sup>b</sup>	Necrosis <sup>a</sup>	Lesiones celulares <sup>a</sup>
<b>WT Control</b>	+++ (PMN)	++	+++
<b>WT anti-IFN-<math>\gamma</math></b>	++++ (PMN)	+++	+++
<b>KO Control</b>	++/+++ (Mo/Li)	++++	++++
<b>KO anti-IFN-<math>\gamma</math></b>	+++ (Mo/Li)	+	+++

<sup>a</sup>Escala: +: leve; ++:moderada; +++: severa; ++++: extremadamente severa

<sup>b</sup>PMN: Neutrófilos; Mo/Li: monocitos/linfocitos

## Conclusiones

Los resultados descritos en esta primera parte de la tesis indican que:

- Durante la infección con *T. cruzi* se producen IL-17A, IL-17F e IL-17E.
- Tanto las células T como las células no T (NK, neutrófilos y otras) están involucradas en la producción de IL-17A.
- La falta de señalización a través de IL-17RA no afecta la parasitemia, pero compromete el control del parásito en bazo, hígado y corazón en la etapa aguda tardía.
- La ausencia de expresión de IL-17RA incrementa el daño hepático que sobreviene como consecuencia de la infección aguda con *T. cruzi*.
- La ausencia de IL-17RA durante la infección con *T. cruzi* trae aparejado un incremento en la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$  y TNF.
- La neutralización de IFN- $\gamma$  desde el día 9 pi, atenúa las severas lesiones hepáticas y la incrementada mortalidad a la infección con *T. cruzi* que presentan los ratones en ausencia de IL-17RA.

En síntesis, los resultados de este capítulo muestran que durante la infección con *T. cruzi* se producen distintas citoquinas de la familia de IL-17 y que su señalización a través de IL-17RA juega un papel crítico en la resistencia del hospedador a esta infección parasitaria, al menos en parte, a través del control del parásito en los tejidos y de la modulación de la respuesta inflamatoria y el daño tisular asociado.

En el marco de estos hallazgos, se propuso profundizar el estudio de los mecanismos subyacentes al papel protector de IL-17RA en la infección con *T. cruzi*. Particularmente, se exploró el papel de IL-17RA en la regulación de la respuesta inflamatoria y la inmunopatología asociada (Resultados II), así como su capacidad para modular la respuesta específica involucrada en el control del parasitismo tisular (Resultados III).

## RESULTADOS II

**Estudio del papel de la señalización a través de IL-17RA en la respuesta inmune innata y la regulación de la inflamación durante la infección con *T. cruzi***

La señalización a través de IL-17RA regula el número de neutrófilos en tejidos durante la infección con *T. cruzi*

La señalización a través de IL-17RA participa en el reclutamiento de neutrófilos a tejidos durante la infección con *T. cruzi*

La infección con *T. cruzi* promueve la diferenciación de neutrófilos supresores productores de IL-10

Los neutrófilos regulan in vivo la producción de IFN- $\gamma$  y el daño hepático durante la infección con *T. cruzi*

Conclusiones

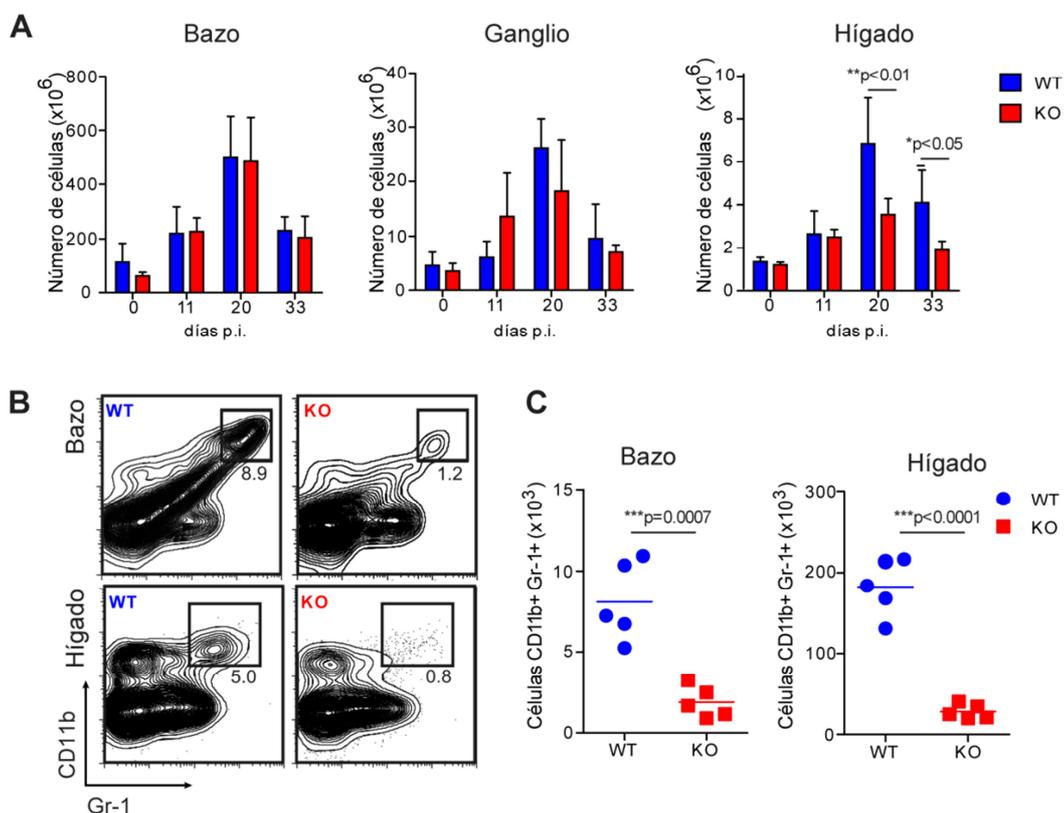
En el marco de los resultados obtenidos hasta el momento, se propuso investigar los mecanismos subyacentes al rol de IL-17RA en la regulación de la respuesta inflamatoria y la inmunopatología asociada a la infección con *T. cruzi*. A pesar de que era factible que las citoquinas IL-17 ejercieran un efecto regulatorio directo sobre los LiT, como estaba reportado en otros contextos inmunológicos [165, 241], las evidencias respecto a la capacidad de las mismas de modular la producción de quemoquinas e intervenir en el reclutamiento de distintas poblaciones celulares (especialmente neutrófilos) [161], argüían a favor de un mecanismo indirecto. En este sentido y en relación a las diferencias preliminares observadas a nivel del infiltrado leucocitario (figura 15B y Tabla I), se cuantificó y caracterizó la distribución de poblaciones inmunes en tejido de animales IL-17RA KO infectados. Tras hallarse diferencias significativas en el tipo de células que conformaban el infiltrado inflamatorio, se evaluó el mecanismo involucrado y su posible relación con la inflamación.

#### **La señalización a través de IL-17RA regula el número de neutrófilos en tejidos durante la infección con *T. cruzi***

La migración leucocitaria y el infiltrado inflamatorio de tejidos han demostrado ser factores claves para la resolución de infecciones y la inmunopatología ligada a ellas [242, 243]. Particularmente en la enfermedad de Chagas, se ha reportado que células infiltrantes presentan distintos patrones asociados a las etapas de infección y al desarrollo de la patología [58, 244]. Se propuso entonces evaluar la distribución de poblaciones inmunes en órganos linfáticos secundarios u órganos diana y estudiar la potencial relación entre la misma y la desregulación de la producción de IFN- $\gamma$  observada en los ratones IL-17RA KO infectados. En un primer lugar, se cuantificó el número absoluto de células de bazo, ganglios e hígado de los ratones WT e IL-17RA KO infectados a varios días pi (días 0, 11, 20 y 33 pi). La cantidad de células en órganos linfáticos secundarios a lo largo de todo el proceso infeccioso fue similar en ambos grupos. Sin embargo, los animales IL-17RA KO infectados mostraron menor número de leucocitos en hígado a los días 20 y 33 pi (figura 19A). A fin de evaluar la composición del infiltrado celular y considerando el estrecho vínculo entre las citoquinas de la familia de IL-17 y la biología de los neutrófilos [161], se determinó por citometría de flujo la frecuencia y número absoluto de estos últimos. Así, suspensiones celulares obtenidas de bazo e hígado de ratones WT y IL-17RA KO infectados (día 20 pi) fueron marcadas con anticuerpos que reconocían CD11b y Gr-1, dos moléculas

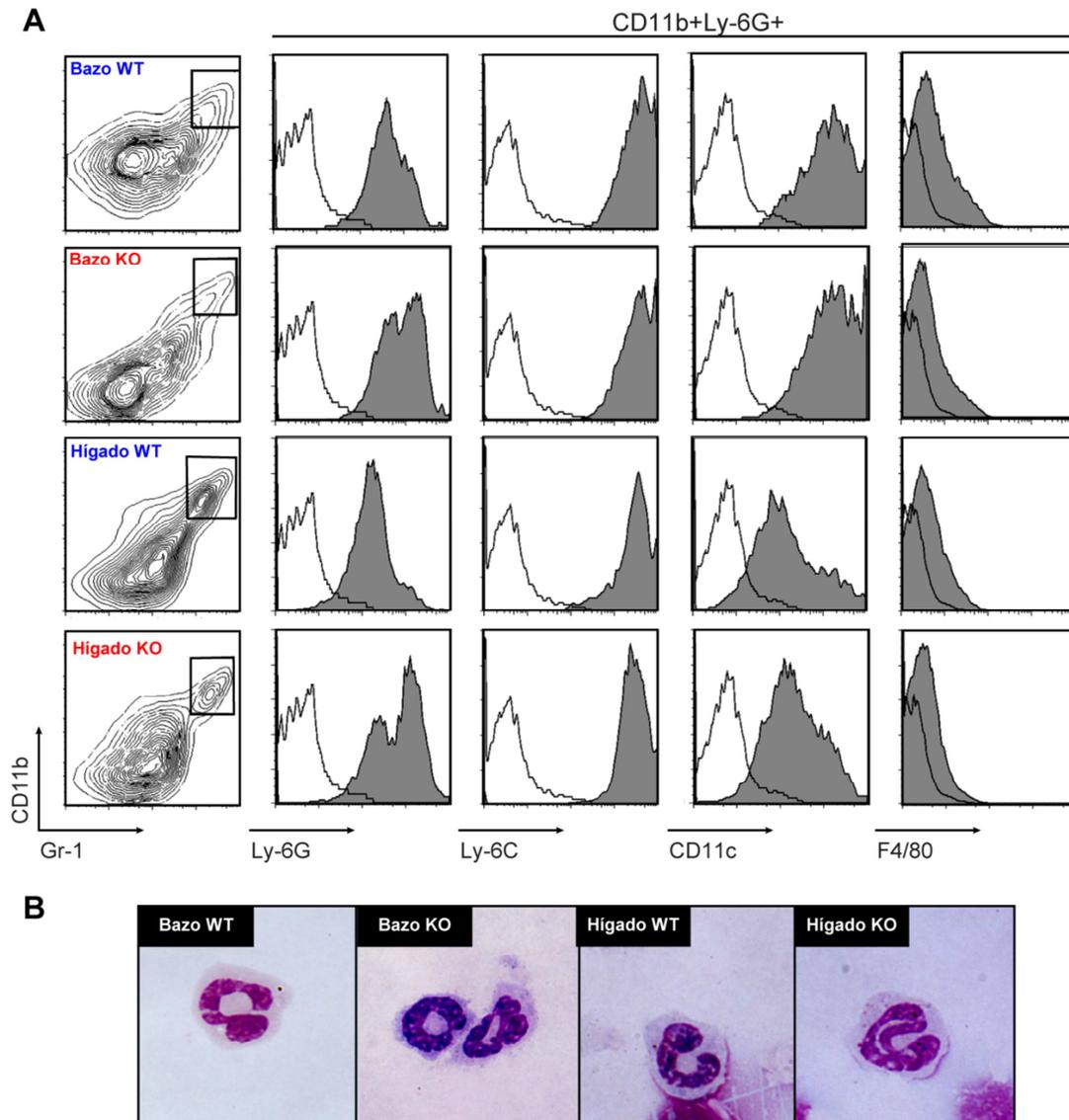
simultáneamente expresadas en la superficie de los neutrófilos. Como puede apreciarse en la figura 19B y 19C, bazo e hígado de los ratones IL-17RA KO infectados presentaron una frecuencia significativamente menor de neutrófilos que sus contrapartes WT.

En relación a que cantidades variables CD11b y Gr-1 se expresan en diversas poblaciones celulares que incluyen no sólo neutrófilos, sino monocitos, eosinófilos y células mieloides inmaduras, se propuso caracterizar en detalle al fenotipo y la morfología de las células CD11b+Gr-1+ en la infección. En primer lugar, se determinó por citometría de flujo la expresión de marcadores poblacionales mieloides en células totales de bazo e hígado de ratones WT e IL-17RA KO al día 20 pi con *T. cruzi*. En los dos órganos analizados, las cepas de animales no manifestaron diferencias entre sí, y las células CD11b+Gr-1+ de



**Figura 19: Los ratones IL-17RA KO infectados con *T. cruzi* presentan disminuida cantidad de células CD11b+Gr-1+.** **A)** Número de leucocitos totales de bazo, ganglio e hígado de animales WT (azul) e IL-17RA (rojo) infectados a diferentes tiempos de infección. Los resultados expresan el promedio de los recuentos de 5 ratones por grupo  $\pm$  DE. Los valores de p se calcularon a través de ANOVA seguido del post-test de Bonferroni. **B)** Porcentaje y **C)** número absoluto de células CD11b+Gr-1+ en bazo e hígado de animales WT e IL-17RA KO infectados al día 20 pi con *T. cruzi*. **B)** Los gráficos muestran un animal representativo de 5 ratones por grupo. **C)** Cada símbolo representa ratones individuales y la línea horizontal indica el promedio de todos ellos. Las diferencias entre ambos grupos, reflejadas en el valor de p, se calcularon con el Test-T de dos colas. Los resultados de A-C son representativos de cuatro experimentos independientes.

ambos grupos experimentales mostraron un patrón compatible con neutrófilos, a saber: alta expresión de Ly6G y Ly6C, y baja expresión de F4/80 (figura 20A). Además, se observaron algunas particularidades según el tejido: la expresión de CD11c fue alta en bazo mientras que moderada en hígado. En segundo lugar, se realizó un estudio morfológico de las células CD11b+Gr1+ purificadas por



**Figura 20: Las células CD11+Gr-1+ infiltrantes de bazo e hígado de animales infectados con *T. cruzi* presentan fenotipo y morfología compatibles con neutrófilos. A) Expresión de Ly-6G, Ly-6C, CD11c y F4/80 de animales WT e IL-17RA KO al día 20 pi con *T. cruzi*. Los gráficos de cada grupo muestran un animal representativo de cinco. B) Morfología de células CD11b+Gr-1+ de bazo e hígado de animales WT e IL-17RA KO después de 20 días de infección. Los resultados que se muestran en A y B son representativos de dos experimentos independientes.**

*cell sorting* de hígado y bazo de ratones WT e IL-17RA KO al día 20 pi. Una vez enriquecidas, las células fueron concentradas por la técnica de *cytospin*, teñidas con hematoxilina/eosina y analizadas al microscopio óptico. Como se observa en las fotografías de la figura 20B, la población CD11b+Gr1+ de bazo e hígado de ambos grupos experimentales mostró una morfología granular con núcleos multilobulados, compatible con neutrófilos.

Estos resultados en conjunto sugirieron que, en contexto de la infección con *T. cruzi*, la señalización de IL-17RA favorece el infiltrado de neutrófilos CD11b+Gr1+ en bazo y principalmente en hígado.

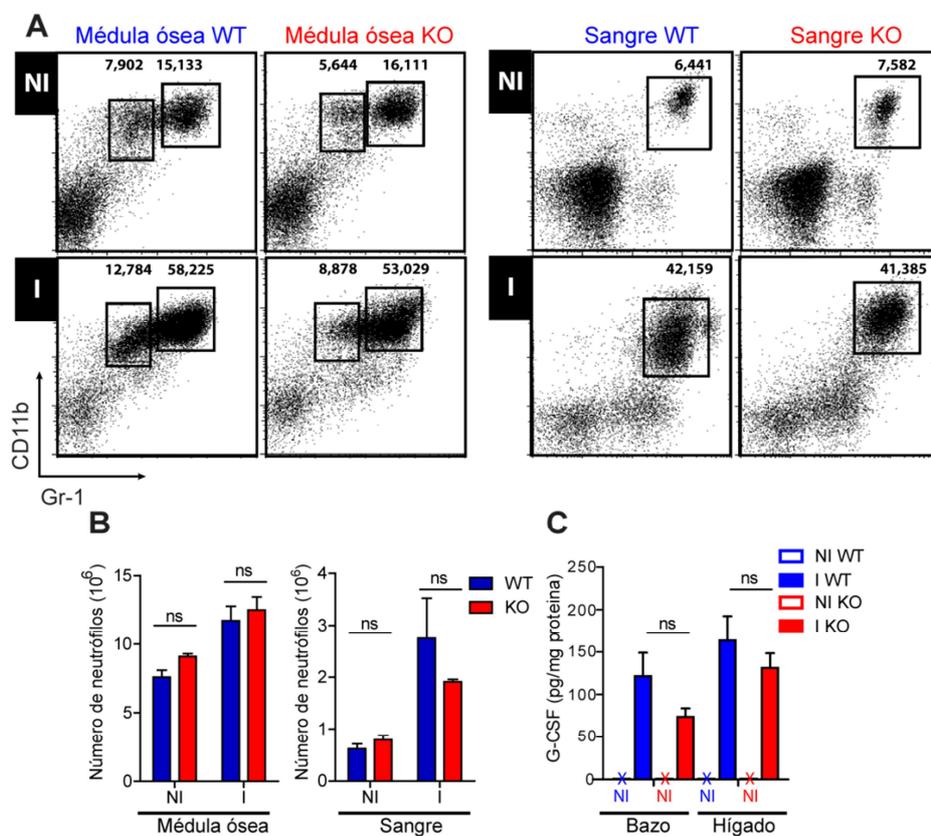
### **La señalización a través de IL-17RA participa en el reclutamiento de neutrófilos a tejidos durante la infección con *T. cruzi***

Gran cantidad de publicaciones han descrito la relación entre las citoquinas de la familia IL-17 y la biología de los neutrófilos [144, 167, 175]. Particularmente se conoce que IL-17A, IL-17F e IL-17C son capaces tanto de estimular la mielopoyesis como de favorecer el reclutamiento de neutrófilos en tejidos, y su papel en este sentido ha sido ampliamente explorado en infecciones. De esta forma, era posible que alguno de estos mecanismos, o ambos al mismo tiempo, estuviesen involucrados en la reducción del número de neutrófilos en ratones IL-17RA KO durante la infección con *T. cruzi*. Consecuentemente, se estudiaron ambas opciones.

Con objetivo de evaluar un posible compromiso de la mielopoyesis, se determinó por citometría de flujo el porcentaje y número absoluto de neutrófilos en médula ósea y sangre periférica de ratones WT y IL-17RA KO después de 20 días de infección con *T. cruzi*, utilizando ratones no infectados como control. Como se observa en la figura 21A y B, el porcentaje de neutrófilos aumentó por igual en ambas cepas frente a la infección. Estos resultados sugirieron que la ausencia de IL-17RA no afecta significativamente la generación y/o circulación de neutrófilos en la infección. Para reforzar estos hallazgos, se cuantificó la concentración de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Este factor de crecimiento es crucial para la producción de neutrófilos en estados de salud y enfermedad; y es responsable del dramático incremento del número de neutrófilos que acontece frente a infecciones. De relevancia para estos estudios, G-CSF está involucrado en la maduración de los precursores de médula ósea a neutrófilos, se produce en tejidos y su expresión está modulada por las citoquinas de la

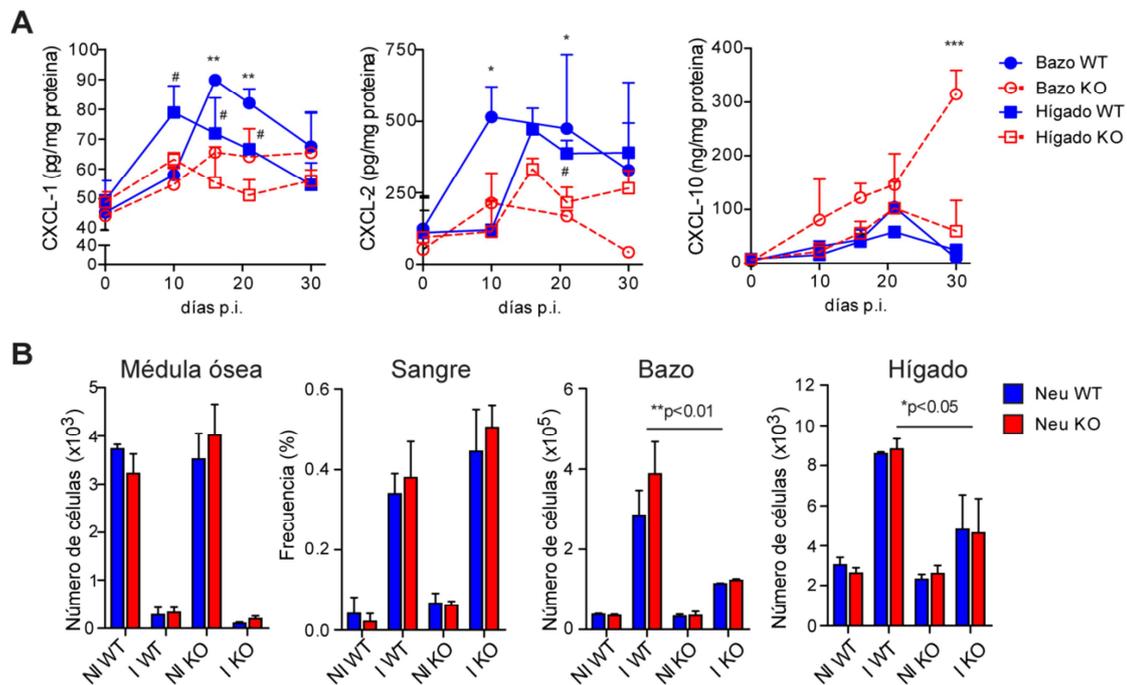
familia de IL-17 (revisado por Benedath y Bradstock [245]). Entonces, se determinó G-CSF en homogenatos de bazo e hígado de ratones WT e IL-17RA KO no infectados y al día 20 pi mediante la técnica de CBA. Las concentraciones de G-CSF obtenidas se normalizaron respecto de la cantidad de proteínas totales en tejido, cuantificadas por la técnica de Bradford [246]. De forma compatible con los resultados precedentes, ambas cepas incrementaron de modo semejante la producción de G-CSF frente la infección (figura 21C). Este hallazgo fortaleció la hipótesis de que, en contexto de la infección, la ausencia de señalización de IL-17RA no compromete la mielopoiesis.

A continuación se realizaron experimentos que tuvieron por objetivo evaluar el papel de IL-17RA en el reclutamiento de los neutrófilos hacia los tejidos. En primer lugar se cuantificaron quemoquinas en



**Figura 21. La ausencia de IL-17RA durante la infección no altera la mielopoiesis.** **A)** Porcentajes y **B)** números absolutos de neutrófilos en médula ósea y sangre de animales WT e IL-17RA KO no infectados o luego de 20 días de infección con *T. cruzi*. **A)** Gráficos de un animal representativo de 5 por grupo. **B)** Los números absolutos se calcularon en ambos casos, al multiplicar la frecuencia de células CD11b+Gr-1+ por la cantidad de células totales (médula ósea) o por mL (sangre). Los valores muestran el promedio del recuento  $\pm$  DE de 5 ratones **C)** Concentraciones de G-CSF en homogenatos de bazo e hígado de animales WT e IL-17RA KO sin infectar o al día 20 pi con *T. cruzi*. Los resultados se normalizaron a la concentración total de proteínas y se expresan como la media  $\pm$  DE de triplicados biológicos, n=5 ratones por grupo. Los valores de p fueron calculados con test-T de dos colas. Los resultados en A-C son representativos de dos experimentos independientes.

bazo e hígado de animales WT e IL-17RA-KO a distintos tiempos de infección. Particularmente se evaluó a CXCL1 (o KC) y CXCL2 (o MIP-2), proteínas que reclutan neutrófilos y se producen en respuesta a IL-17A [167, 247, 248]. Además, se determinó como control CXCL10 (o IP10), una molécula que no interviene en el tráfico neutrófilos y es inducida por IFN- $\gamma$  [249]. Las concentraciones de CXCL1 por un lado y las de CXCL2 y CXCL10 por otro, fueron determinadas por CBA y ELISA respectivamente, en homogenatos de bazo e hígado de ratones WT e IL-17RA KO no infectados o al día 10, 20 y 30 pi. Para las tres quemoquinas, los valores se normalizaron a las cantidades de proteínas totales. Como puede observarse en la figura 22A, los animales WT infectados presentaron mayores concentraciones de CXCL1 y CXCL2 en los dos órganos estudiados, con una cinética que acompañó los niveles de parasitemia. Aunque los ratones IL-17RA KO respondieron a la infección en el mismo sentido que los WT, mostraron concentraciones de CXCL1 y CXCL2 significativamente reducidas en relación a sus homólogos WT a distintos tiempos cercanos al pico de parasitemia. Por otro lado y de manera consecuente a las altas cantidades de IFN- $\gamma$ , la concentración de CXCL10 fue mayor en animales IL-17RA KO infectados que en los WT, aunque la diferencia fue significativa sólo al día 30 pi (figura 22A). Estos resultados indicaron que la ausencia de IL-17RA durante la infección con *T. cruzi* compromete la producción de quemoquinas que regulan el reclutamiento de neutrófilos a tejido. En segundo lugar, se propuso evaluar directamente la capacidad migratoria de neutrófilos en hospedadores WT e IL-17RA infectados y al mismo tiempo probar si la misma estaba afectada por la expresión de IL-17RA en los propios neutrófilos. Para ello células con alta expresión de Ly6G (neutrófilos) fueron purificadas con perlas magnéticas de médula ósea de animales WT e IL-17RA no infectados, y teñidas con trazadores fluorescentes diferentes: CFSE y SNARF respectivamente. Posteriormente cantidades iguales de las mismas, fueron transferidas simultáneamente por vía endovenosa en cuatro grupos experimentales: ratones WT e IL-17RA-KO al día 20 pi con *T. cruzi*, y sus contrapartes no infectadas como controles. Luego de 3 h, se estudió el patrón de distribución de las células inyectadas determinando la presencia de los neutrófilos WT (CFSE+) e IL-17RA KO (SNARF+) en médula ósea, sangre, bazo e hígado por citometría de flujo. Como puede observarse en la figura 22B, la distribución de los neutrófilos inyectados fue idéntica independientemente de la expresión de IL-17RA en los propios neutrófilos. Por otro lado, la infección afectó de manera notable la distribución de los neutrófilos transferidos: mientras que en ratones no infectados estas células se ubicaron mayoritariamente en médula ósea; en



**Figura 22. La ausencia de IL-17RA durante la infección afecta el reclutamiento de neutrófilos a tejido. A)** Concentración de CXCL1, CXCL2 y CXCL10 en homogenatos de bazo e hígado de ratones WT e IL-17RA KO a distintos tiempos de infección. Los resultados se normalizaron a la cantidad total de proteína y se expresan como el promedio  $\pm$  DE de triplicados biológicos,  $n=5$  animales por grupo. Los valores de  $p$  se calcularon con test ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni (\*  $p$ : bazo WT vs bazo KO; #  $p$ : hígado WT vs hígado KO). **B)** Número absoluto o frecuencia de neutrófilos WT e IL-17RA KO detectados 3 h después de su transferencia adoptiva, en médula ósea, sangre, bazo e hígado de ratones WT e IL-17RA KO no infectados (NI) o luego de 20 días de infección (I). Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  DE,  $n=5$  animales por grupo. Los valores de  $p$  se calcularon con test-T de dos colas. Los datos de A y B son representativos de dos experimentos independientes.

ratones infectados con *T. cruzi* se hicieron presentes principalmente en sangre, bazo e hígado. Particularmente en el contexto de la infección, la expresión de IL-17RA en las células del hospedador, impactó notablemente en la distribución de los neutrófilos inyectados. Así, aunque en sangre no se evidenciaron diferencias, ratones IL-17RA KO infectados mostraron un número significativamente menor de neutrófilos en bazo e hígado que sus contrapartes WT. Este reducido reclutamiento de neutrófilos transferidos a los tejidos de ratones IL-17RA KO infectados fue compatible con la menor cantidad de quemoquinas CXCL1 y CXCL2 que presentaron en hígado y bazo.

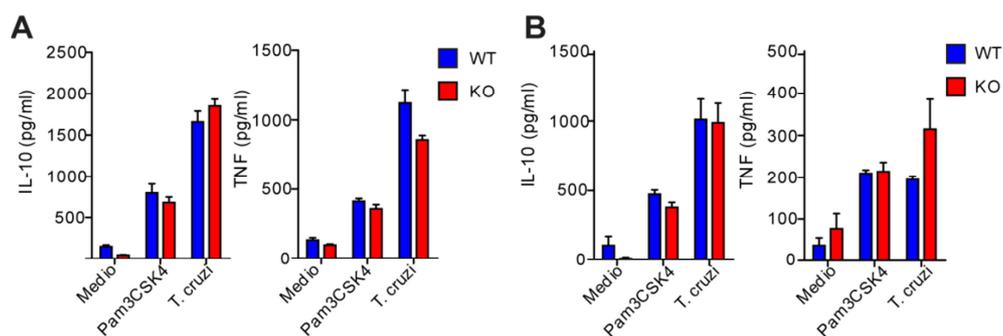
En síntesis, estos resultados confirmaron que durante la infección con *T. cruzi* las células del hospedador requieren de la señalización a través de IL-17RA, más que para incentivar la mielopoyesis,

para inducir quemoquinas como CXCL1 y CXCL2 que promuevan el reclutamiento de neutrófilos a tejidos.

### La infección con *T. cruzi* promueve la diferenciación de neutrófilos supresores productores de IL-10

A pesar de que la función de los neutrófilos ha estado históricamente ligada a su capacidad fagocítica, en los últimos años se han publicado numerosos reportes que resaltan su importancia respecto de otras funciones, como por ejemplo la secreción de citoquinas y la modulación de poblaciones celulares [179]. Entre estos últimos, se destacan los hallazgos de Zhang y col. De Santo y col. [250, 251] en relación a la función inmunoregulatoria y dependiente de la producción de IL-10 que los neutrófilos ejercen en modelos de infección y cáncer. En este sentido, era factible que los neutrófilos en la infección con *T. cruzi* modularan la inflamación. Se propuso entonces estudiar la capacidad inmunoregulatoria de los neutrófilos en la infección a través de la evaluación de las citoquinas que producen frente al parásito y en el contexto de infección, y su capacidad supresora.

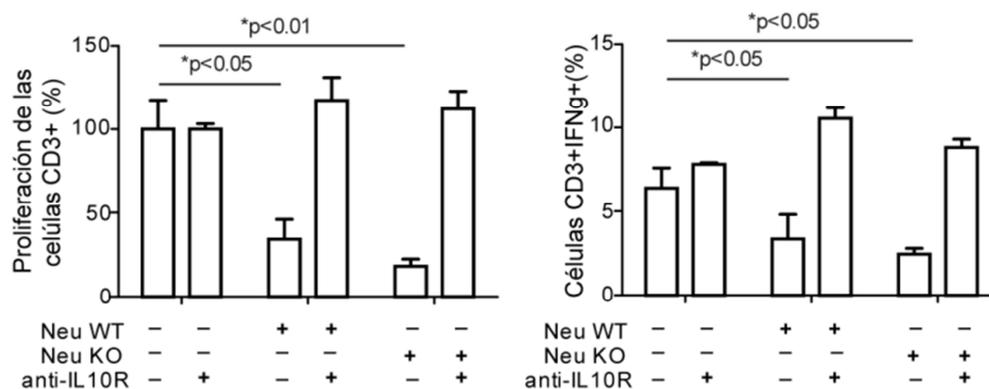
En un primer estudio, neutrófilos de ratones WT e IL-17RA KO no infectados fueron purificados de médula ósea por selección positiva con perlas magnéticas y cultivados 48 h sin estímulo, con tripomastigotes de *T. cruzi* vivos, o con Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, un agonista de TLR1/2 que favorece la producción de IL-10 y la adquisición de un fenotipo regulatorio en neutrófilos. Los sobrenadantes de cultivo fueron



**Figura 23. Los neutrófilos estimulados con *T. cruzi* producen IL-10 y TNF. A)** Concentración de IL-10 y TNF determinada en sobrenadante de 48 h de cultivo de neutrófilos Ly-6G+ enriquecidos de médula ósea de ratones WT e IL-17RA KO estimulados según se indica. **B)** Concentración de IL-10 y TNF determinada en sobrenadante de 48 h de cultivo de neutrófilos CD11b+Gr-1+ purificados por *cell sorting* de bazo de animales WT e IL-17RA KO infectados al día 20 pi, y estimulados como se indica. Los resultados **A-B** se muestran como el promedio  $\pm$  DE de cuadruplicados de cultivo. Los valores de *p* se calcularon con Test-T de dos colas. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

evaluados luego para diferentes citoquinas. Los resultados indicaron que, de manera independiente a la expresión de IL-17RA, el parásito estimula la producción de IL-10 y TNF en los neutrófilos, pero no así otras citoquinas inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12p70 (figura 23A y datos no mostrados). Es importante resaltar que las cantidades de IL-10 determinadas en cultivos de neutrófilos estimulados con el parásito fueron incluso mayores a las registradas en los cultivos con Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>. Posteriormente, se evaluó el perfil de citoquinas producidas por los neutrófilos procedentes de tejido de animales infectados. Para ello, se purificaron por *cell sorting* células CD11b+Ly6G+ de bazo de ratones WT e IL-17RA-KO después de 20 días de infección y se realizaron los mismos cultivos que en el caso anterior. De manera similar, los sobrenadantes de cultivo de neutrófilos infectados estimulados con el parásito mostraron altas concentraciones de IL-10, mayores a las producidas en cultivos con Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>; mientras que la secreción de TNF fue similar con ambos estímulos (figura 23B). Estos resultados respaldan que, frente al parásito y en contexto de la infección con *T. cruzi*, los neutrófilos producen altas concentraciones de IL-10, y consecuentemente podrían ejercer una función regulatoria como la reportada en otros modelos [250, 251].

Con el objetivo de evaluar un posible efecto regulatorio de los neutrófilos sobre otras poblaciones celulares durante la infección por *T. cruzi*, se realizaron experimentos típicos de supresión *in vitro*. Para ello, esplenocitos totales obtenidos de ratones WT no infectados (células respondedoras) fueron teñidos con CFSE y cultivados por cinco días en presencia del estímulo policlonal de linfocitos T: anti-CD3 y anti-CD28. La proliferación máxima que presentaron los LiT respondedores presentes en células de bazo cultivadas solas (determinada por dilución del CFSE), se comparó con aquella acontecida en presencia de neutrófilos purificados de bazo de ratones WT e IL-17RA al día 20 pi (relación 5:1). De manera adicional y a fin de evaluar si el efecto estaba mediado por IL-10, algunos co-cultivos fueron tratados con anticuerpos bloqueantes para el receptor esta citoquina. Como evidencian los resultados de la figura 24, los LiT (células CD3+) presentes en las células de bazo totales co-cultivados con neutrófilos, mostraron una reducida proliferación y producción de IFN- $\gamma$  en comparación con aquellos LiT de esplenocitos cultivados en ausencia de neutrófilos. Además, en los co-cultivos realizados en presencia del anticuerpo neutralizante de IL-10R se restablecieron los valores máximos de proliferación y de producción de IFN- $\gamma$ , indicando que la capacidad regulatoria de los neutrófilos esta mediada por



**Figura 24. Los neutrófilos de animales infectados con *T. cruzi* suprimen respuestas de linfocitos T.** Proliferación (izquierda) y porcentaje de células productoras de IFN- $\gamma$  (derecha) en la población CD3+ de esplenocitos de animales WT no infectados, luego de 5 días de estímulo en placa con anti-CD3 anti-CD28. Los cultivos contaron con la presencia/ausencia (según se indica), de neutrófilos CD11b+Gr-1+ purificados de bazo de ratones WT e IL-17RA KO infectados al día 20 pi (relación 5:1) y del anticuerpo bloqueante IL-10R. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  de triplicados. Los valores de p se calcularon con test-T de dos colas. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

IL-10. Una vez más, los neutrófilos IL-17RA KO mostraron las mismas propiedades que los de origen WT.

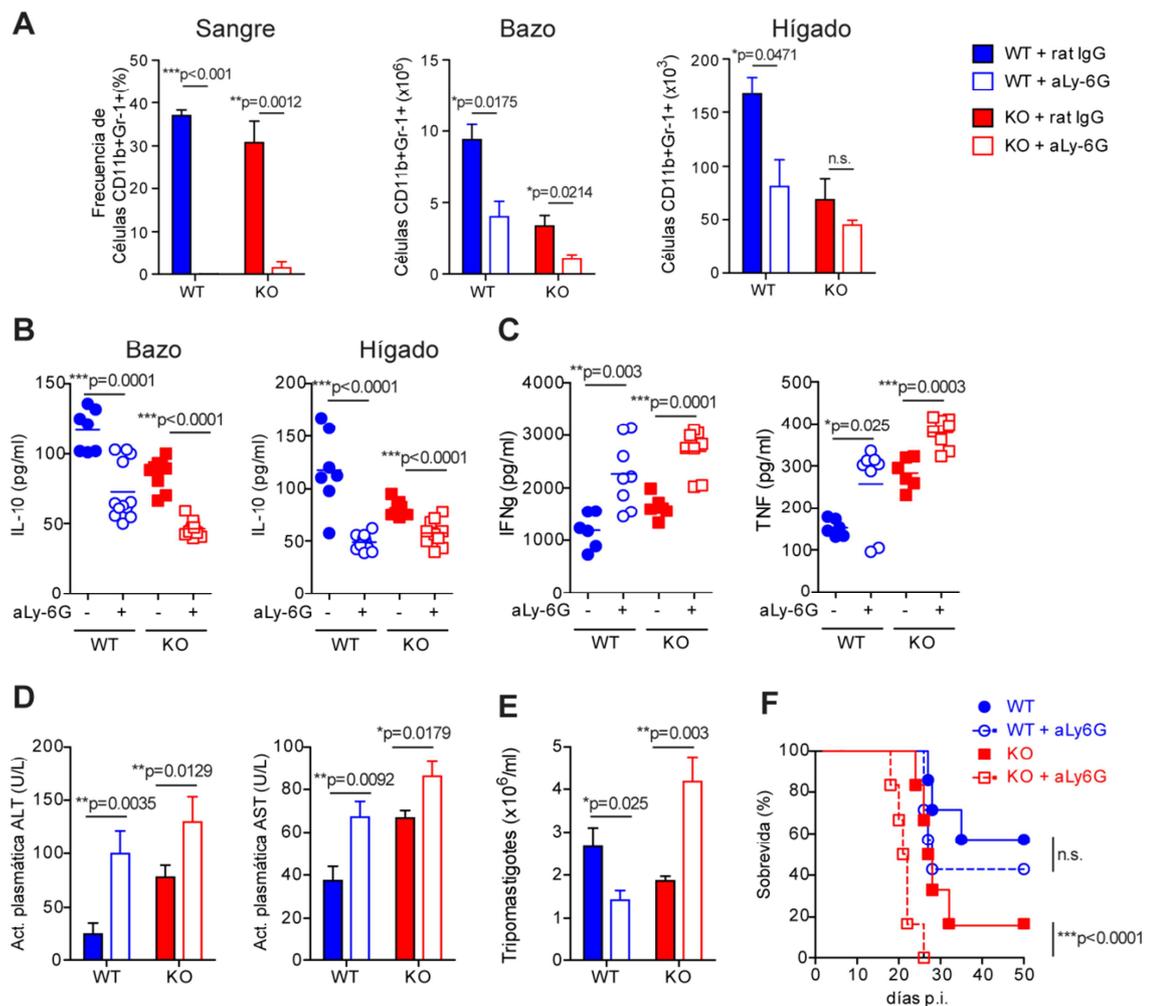
En resumen, en contexto de la infección con *T. cruzi* los neutrófilos tienen capacidad de producir altas cantidades de IL-10 frente al parásito y de suprimir la proliferación y producción de IFN- $\gamma$  de los LiT, de forma dependiente de IL-10 e independiente a su expresión de IL-17RA.

### **Los neutrófilos regulan *in vivo* la producción de IFN- $\gamma$ y el daño hepático durante la infección con *T. cruzi***

Con propósito de estudiar *in vivo* la relevancia biológica que tienen los neutrófilos y su producción de IL-10 en los tejidos durante la progresión de la infección con *T. cruzi*, se realizaron tratamientos que disminuyeron o incrementaron su cantidad.

En una primera aproximación, se diseñó un experimento de eliminación de neutrófilos con anticuerpos monoclonales. Ratones WT e IL-17RA KO infectados fueron tratados a los días 9, 12, 15 y 18 pi con inyecciones intraperitoneales del anticuerpo anti-Ly6G (clon 1A8) o IgG de rata como control. El esquema de tratamiento se inició al día 9 pi con el fin de evaluar el papel de los neutrófilos en la modulación de la respuesta inmune adaptativa y el control de la inflamación, posterior a su función en

la contención inicial de la infección. Asimismo, las inyecciones repetidas del anticuerpo buscaron una reducción sostenida de neutrófilos que fuese capaz de superar la continua generación de los mismos, particularmente incrementada como consecuencia de la infección. Para controlar la efectividad de la eliminación, se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de neutrófilos (CD11b+Gr1+) en sangre,

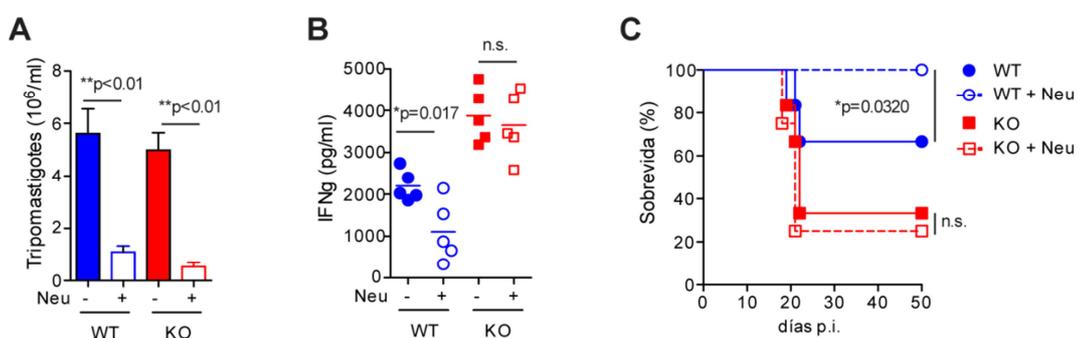


**Figura 25: La depleción de neutrófilos en animales WT e IL-17RA KO infectados con *T. cruzi* altera la producción de IFN- $\gamma$ , el daño tisular y la susceptibilidad a la infección.** Animales WT e IL-17RA KO infectados con *T. cruzi* fueron tratados con anticuerpos anti-Ly-6G o con anticuerpo control a los días 9, 12, 15 y 18 pi y **A-E**) sacrificados al día 20 pi para evaluar distintos parámetros y **F**) evaluados en su sobrevivencia a lo largo del tiempo. **A**) Frecuencia y número absoluto de células CD11b+Gr1+ en sangre, bazo e hígado. **B**) Concentración de IL-10 determinada en sobrenadante de 48 h de cultivo de suspensiones celulares de bazo e hígado. Cada símbolo representa diferentes animales y la línea horizontal señala la media. **C**) Concentraciones de IFN- $\gamma$  y TNF en plasma. Cada símbolo representa diferentes animales y la línea horizontal el valor promedio de la determinación. **D**) Actividad plasmática de ALT y AST. **E**) Parasitemia. Los resultados de **A-E** se muestran como la media  $\pm$  DE, n=6-8 animales por grupo y los valores de p se calcularon con test-T de dos colas. **F**) Sobrevivencia. Los valores de p se calcularon con el test de Gehan-Breslow-Wilcoxon, n=12 animales por grupo. Los resultados de **A-E** y **D** son representativos de tres y dos experimentos independientes, respectivamente.

bazo e hígado de los animales tratados al día 20 pi (dos días posteriores a la última inyección). Como se observa en la figura 25A, si bien el tratamiento con anticuerpos anti-Ly6G no eliminó totalmente la población de neutrófilos, sí la disminuyó significativamente en todos los tejidos/órganos analizados, con la única excepción del hígado en el grupo IL-17RA KO. Para evaluar el efecto de esta reducción de neutrófilos en la progresión de la infección, se analizaron al día 20 pi (dos días después de la última inyección) las concentraciones de IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF, el daño tisular y la parasitemia de los animales de distintos grupos experimentales. Además, se evaluó la sobrevida como medida general de susceptibilidad a la infección. En primer lugar se determinó por ELISA la concentración de IL-10 en los sobrenadantes de suspensiones celulares de bazo e hígado cultivados durante 48 h en ausencia de estímulo exógeno. Como se observa en la figura 25B, el tratamiento anti-Ly6G redujo la producción de IL-10 por parte de las células de bazo e hígado en ambas cepas. Estos resultados indicaron que los neutrófilos constituyen una importante fuente de IL-10 durante la infección con *T. cruzi*, o bien condicionan a otras células a producir IL-10. En segundo lugar se cuantificó por ELISA, IFN- $\gamma$  y TNF en plasma. Los ratones WT e IL-17RA KO tratados con anticuerpo anti-Ly6G incrementaron las concentraciones sistémicas de ambas citoquinas respecto a los que recibieron el anticuerpo control, reforzando un perfil Th1 (figura 25C). En tercer lugar, se analizaron la actividad plasmática de las transaminasas hepáticas. De manera consecuente a la mayor inflamación, la depleción de neutrófilos cursó con un incremento de la actividad de ambas enzimas (figura 25D), sugiriendo que la presencia de neutrófilos previene el daño hepático. En relación al control parasitario, el tratamiento de depleción tuvo efectos disímiles en ambas cepas de ratones, observándose una menor parasitemia en los ratones WT infectados y tratados y una mayor parasitemia en aquellos ratones IL-17RA KO infectados y tratados (figura 25E). En el primer caso, es probable que el incremento de IFN- $\gamma$  haya potenciado el daño tisular pero también colaborado con el control del parásito. En el caso de los animales IL-17RA KO, es posible que el incremento aún más exacerbado de las concentraciones de IFN- $\gamma$  desencadenado por el tratamiento, haya comprometido gravemente la integridad de los tejidos y ocasionado un crecimiento descontrolado del parásito. Todos estos efectos diferenciales del tratamiento con anti-Ly6G en ambas cepas impactaron de forma diferente en la susceptibilidad de los hospedadores a la infección ya que no modificó la mortalidad de ratones WT infectados pero disminuyó significativamente la sobrevida de los animales IL-17RA KO (figura 25F). Se especula en tal sentido, que

la eliminación casi completa de los neutrófilos en ratones los IL-17RA KO tratados con Ly6G y la consiguiente pérdida de su potencial regulatorio desencadenó una infección terminal, con un gran aumento de la inflamación, y altos niveles de parásito circulante. En conjunto, los resultados de este experimento indican que la ausencia de neutrófilos correlaciona con un perfil inflamatorio exacerbado que potencia la susceptibilidad de los animales IL-17RA KO a la infección con *T. cruzi*.

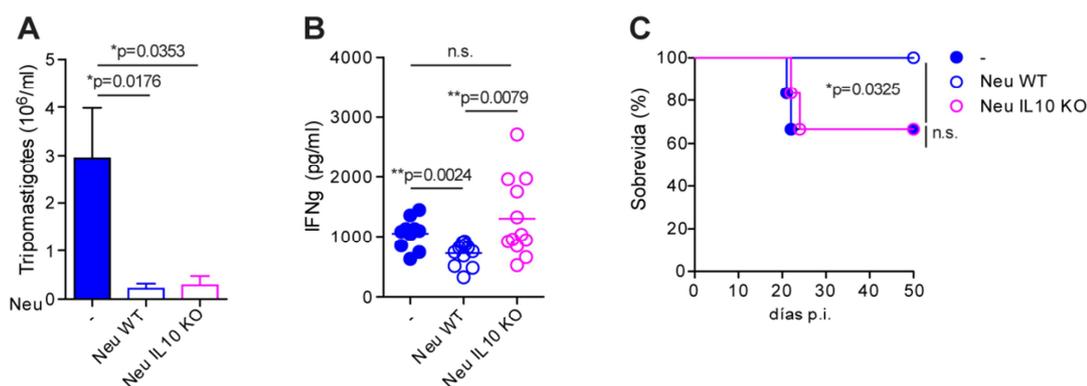
Como segunda aproximación experimental para evaluar la relevancia biológica de los neutrófilos en la infección con *T. cruzi* se reforzaron la cantidad de neutrófilos a través de transferencias adoptivas. Neutrófilos de médula ósea de ratones WT no infectados fueron purificados por selección positiva con perlas magnéticas, e inyectados por vía endovenosa en ratones WT e IL-17RA KO a los días 9, 12, 15 y 18 pi. Este esquema fue seleccionado con objeto de evaluar el efecto de los neutrófilos en la modulación de la respuesta inmune adaptativa y fortalecer el control de la inflamación. En los ratones WT e IL-17RA KO infectados y transferidos con neutrófilos o inyectados con PBS (controles) se evaluó la parasitemia, respuesta inflamatoria y sobrevida a la infección. Estos resultados deben contemplarse atendiendo a que, como se describió anteriormente, los hospedadores IL-17RA infectados muestran en comparación con los WT una menor capacidad para reclutar neutrófilos a tejidos (figura 22). Como puede observarse en la figura 26A, a los 20 días de infección los ratones WT e IL-17RA KO transferidos mostraron menor parasitemia que los controles inyectados con PBS. Este resultado indicó que los neutrófilos participan en el control directo del parásito, de manera independiente a su habilidad para



**Figura 26. La transferencia adoptiva de neutrófilos modula la producción de IFN- $\gamma$  y la sobrevida a la infección con *T. cruzi*.** Animales WT e IL-17RA KO infectados fueron transferidos con neutrófilos WT o inyectados con PBS a los días 9, 12, 15 y 18 pi. **A-B)** Al día 20 pi se determinó **A)** la parasitemia y **B)** la concentración plasmática de IFN- $\gamma$ . Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE, n=6 por grupo. Los valores de p se calcularon con test-T de dos colas. **C)** Sobrevida. Los valores de p se calcularon con el test de Gehan-Breslow-Wilcoxon, n=12 animales por grupo. Los resultados A-C son representativos de dos experimentos independientes.

migrar a los tejidos periféricos. Por el contrario, la inyección de neutrófilos sólo logró disminuir las concentraciones plasmáticas de IFN- $\gamma$  en los ratones WT infectados (figura 26B). La incapacidad de los neutrófilos transferidos para regular los altos niveles de IFN- $\gamma$  en hospedadores IL-17RA KO probablemente sea consecuencia de su menor reclutamiento a tejido (figura 19C y 22B). Por último, los ratones WT transferidos mostraron una menor mortalidad que sus controles no transferidos; mientras que la inyección de neutrófilos no logró disminuir la mortalidad de los animales IL-17 RA infectados (figura 26C). En el caso de los animales WT, la mayor sobrevida fue compatible con las menores cantidades de parásito y la disminuida inflamación que presentaron estos hospedadores al recibir la transferencia adoptiva de neutrófilos. En contraste, a pesar de lograr un mejor control parasitario, la ausencia de efecto de la inyección de neutrófilos en la susceptibilidad de la cepa IL-17RA KO resultaría de la incapacidad de los neutrófilos inyectados para disminuir la inflamación que media el daño y la muerte en estos animales (figura 18D).

Finalmente, se diseñó un nuevo ensayo de transferencia adoptiva en el que se comparó la capacidad regulatoria de los neutrófilos en función de su capacidad para producir IL-10. Se purificaron neutrófilos de médula ósea de animales WT e IL-10 KO no infectados y se inyectaron en animales WT infectados, siguiendo el mismo esquema de transferencia que en el experimento anterior (a los días 9, 12, 15 y 18 pi). Posteriormente se evaluó en estos ratones la parasitemia y concentración de IFN- $\gamma$  (a los 20 días pi), así como su sobrevida. Habida cuenta la deficiencia de hospedadores IL-17RA en el reclutamiento de neutrófilos tanto endógenos como transferidos, en este experimento se decidió no utilizar esta cepa de ratones. Como puede observarse en la figura 27A, tanto neutrófilos WT como IL-10 KO fueron igualmente capaces de reducir la parasitemia al día pico de infección. Sin embargo, y en sintonía con los experimentos *in vitro* (figura 24), la inyección de los neutrófilos deficientes de IL-10 no disminuyó los niveles plasmáticos de IFN- $\gamma$  como si lo hicieron aquellos que produjeron esta citoquina inmunomoduladora (figura 27B). En el mismo sentido, mientras que la transferencia de células que producían IL-10 fue eficiente en mejorar la sobrevida de los animales, la inyección de neutrófilos deficientes de IL-10 no fue capaz de extender la sobrevida de los ratones (figura 27C). De esta manera, se logró probar que la capacidad regulatoria de la inflamación que presentan los neutrófilos en la infección es, también *in vivo*, dependiente de IL-10.



**Figura 27. La actividad regulatoria de los neutrófilos en la infección con *T. cruzi* está mediada por IL-10.** Animales WT infectados fueron transferidos con neutrófilos WT o IL-10 KO. **A-B)** Al día 20 pi se determinó **A)** la parasitemia y **B)** la concentración plasmática de IFN- $\gamma$ . Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE, n=6 por grupo. Los valores de p se calcularon con test-T de dos colas. **C)** Supervivencia. Los valores de p se calcularon con el test de Gehan-Breslow-Wilcoxon, n=12 animales por grupo. Los resultados **A-C** son representativos de dos experimentos independientes.

En conjunto estos resultados prueban que las citoquinas de la familia IL-17 regulan las concentraciones de IFN- $\gamma$ , al menos en parte, a través del reclutamiento de neutrófilos que bajo el contexto de la infección son capaces de producir IL-10 y regular la respuesta inflamatoria, ejerciendo un rol protector.

## Conclusiones

Los resultados descriptos en esta sección muestran que:

- La falta de señalización a través de IL-17RA disminuye el número de neutrófilos en bazo e hígado durante la infección con *T. cruzi*.
- Durante la infección con *T. cruzi* la señalización a través de IL-17RA no parece afectar la mielopoyesis, ya que no modifica la concentración plasmática de G-CSF ni la cantidad de neutrófilos en médula ósea y sangre periférica.
- En la infección con *T. cruzi* citoquinas de la familia IL-17 estimulan la producción de CXCL1 y CXCL2 en bazo e hígado y promueven el reclutamiento de neutrófilos de modo independiente a la expresión de IL-17RA en los mismos.
- En contexto de la infección con *T. cruzi*, los neutrófilos muestran un perfil regulatorio: producen IL-10 e inhiben *in vitro* la proliferación y producción de IFN- $\gamma$  de LiT, de manera dependiente de IL-10.

- Durante la infección con *T. cruzi*, los neutrófilos participan en el control del parásito, la regulación de la producción de IFN- $\gamma$  y la disminución de la mortalidad.
- La capacidad de los neutrófilos de disminuir la producción de IFN- $\gamma$  y la disminución de la mortalidad durante la infección con *T. cruzi*, depende de IL-10.

En conjunto estos hallazgos indican que durante la infección con *T. cruzi*, las citoquinas IL-17 y su señalización a través de IL-17RA estimulan la producción de quemoquinas con capacidad de atraer neutrófilos, los cuales tienen la capacidad de producir IL-10 y regular la respuesta inflamatoria mediada por IFN- $\gamma$ , el daño tisular asociado y la susceptibilidad a la infección.

# RESULTADOS III

## Estudio del papel de citoquinas IL-17 en el desarrollo de una respuesta citotóxica específica durante la infección con *T. cruzi*

La señalización a través de IL-17RA influencia críticamente la magnitud de la respuesta de linfocitos T CD8+ específicos en la infección con *T. cruzi*

IL-17RA promueve el mantenimiento de los linfocitos T CD8+ activados durante la infección con *T. cruzi* a través de un mecanismo de señalización intrínseco

La señalización a través de IL-17RA durante la infección con *T. cruzi* sostiene la supervivencia de los linfocitos T CD8+ totales y específicos

Las citoquinas de la familia IL-17 influyen la activación y diferenciación de los linfocitos T CD8+ durante la infección con *T. cruzi*

La señalización a través de IL-17RA durante la infección con *T. cruzi* previene el agotamiento de los linfocitos T CD8+

La expresión de IL-17RA regula el programa transcripcional de los linfocitos T CD8+ activados durante la infección por *T. cruzi*

IL-17A y/o IL-17F modulan la activación, previenen el agotamiento temprano e incrementan la magnitud de la respuesta de linfocitos T CD8+ específicos en la infección con *T. cruzi*

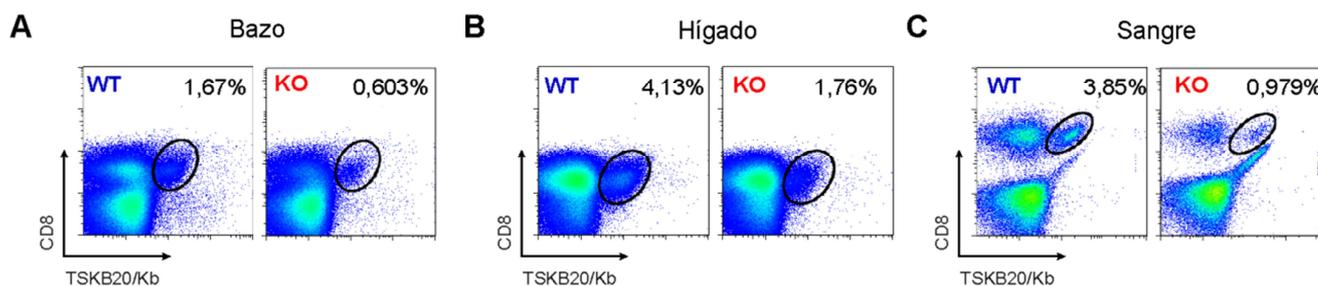
La expresión de IL-17RA en los linfocitos T CD8+ les confiere mayor capacidad protectora durante la infección con *T. cruzi*

Conclusiones

Datos presentados en la sección “Resultados I” de la presente tesis, demostraron que IL-17RA interviene en el control del parasitismo tisular y sugirieron un posible efecto de las citoquinas de la familia IL-17 en el desarrollo y/o mantenimiento de algún mecanismo inmune crítico para la eliminación del parásito en los tejidos y que surge de manera relativamente demorada. En tal contexto y considerando la relevancia de la respuesta de los linfocitos T CD8+ en el control del parásito, se propuso evaluar que ocurría con esta población celular durante la infección cuando se perdía la capacidad de señalar a través de IL-17RA.

### **La señalización a través de IL-17RA influye críticamente la magnitud de la respuesta de linfocitos T CD8+ específicos en la infección con *T. cruzi*.**

Numerosos reportes evidenciaron que frente a la infección con *T. cruzi* se genera una respuesta citotóxica poco diversa, con alto porcentaje de LiT CD8+ específicos para unos pocos epitopes inmunodominantes [252, 253]. Se ha descrito que particularmente los péptidos TSKB20 y PA8 dominan la respuesta T CD8+ en ratones C57BL/6, en estrecha relación con la cepa de parásitos [253]. Es interesante mencionar que estos dos péptidos pertenecen a proteínas distintas, pero muy conservadas en la biología del parásito y altamente inmunogénicas: TSKB20 se corresponde a los aminoácidos 569-576 (ANYKFTLV) de la enzima trans-sialidasa; y PA8 comprende los aminoácidos 552-559 (VNHRFTLV) de la proteína 2 de la superficie del amastigote (ASP-2 del inglés *amastigote surface protein*). De manera relevante, tanto TSKB20 como PA8 muestran restricción a H-2Kb, uno de los haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I presente en la cepa C57BL/6. En relación a estos conocimientos, construcciones proteicas conteniendo tetrámeros de H-2Kb/péptido TSKB20 o PA8 y conjugados a fluorocromos han sido utilizados para identificar a los LiT CD8+ específicos para el parásito presentes en ratones C57BL/6 infectados[253]. Con el objetivo de estudiar los efectos de las citoquinas de la familia de IL-17 sobre la respuesta citotóxica en la infección con *T. cruzi*, se propuso examinar la magnitud de la respuesta de LiT CD8+ específicos para el parásito utilizando la metodología de tetrámeros. Suspensiones celulares de distintos órganos y tejidos de animales WT e IL-17RA KO infectados (día 20 pi) se marcaron con anticuerpos y los tetrámeros TSKB20 o PA8, y se analizaron por citometría de flujo. Como se ilustra la figura 28A-C, los animales WT infectados presentaron un porcentaje relativamente alto de LiT CD8+ específicos para TSKB20 (TSKB20/Kb+) en bazo, hígado y



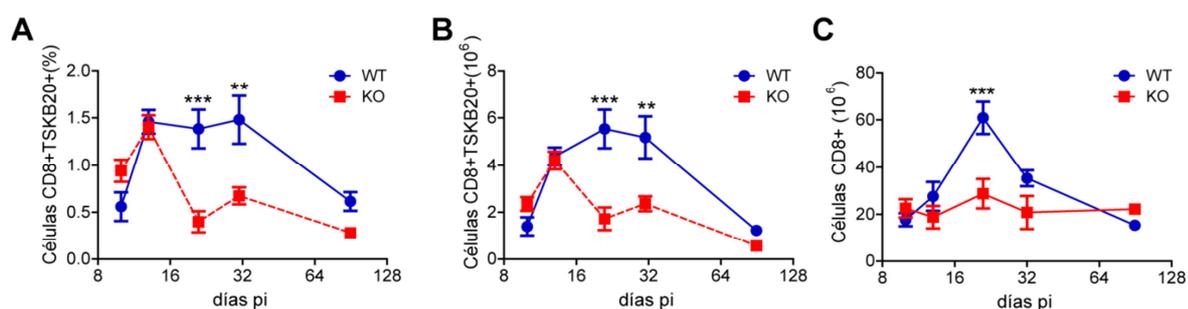
**Figura 28. Los ratones IL-17RA KO infectados con *T. cruzi* presentan reducida magnitud de linfocitos T CD8+ específicos.** Porcentaje de LiT CD8+ TSKB/Kb+ en **A)** bazo, **B)** hígado y **C)** sangre de ratones WT e IL-17RA KO a los 20 días luego de la infección con *T. cruzi*. Los resultados que se muestran son representativos de cinco experimentos independientes. Los gráficos muestran un animal representativo de 5 por grupo. Los resultados mostrados pertenecen a un experimento representativo de cuatro realizados en forma independiente.

sangre; mientras que sus contrapartes IL-17RA KO mostraron una reducida frecuencia de LiT CD8+TSKB20/Kb+ en todos los órganos/tejidos evaluados. Por su parte, no se detectaron LiT CD8+ específicos para PA8 en ninguno de los casos (datos no mostrados). Considerando que las cepas de *T. cruzi* generan patrones de inmunodominancia característicos, se especula que probablemente los LiT CD8+específicos para PA8 no se generaron o se expandieron débilmente luego de la infección con la cepa Tulahuén. Estos resultados indicarían que esta cepa muestra un patrón de inmunodominancia de la respuesta citotóxica diferente a la de la cepa Brazil donde originalmente se describieron los LiT CD8+ con esta especificidad [252]. Estos primeros resultados respecto de la respuesta citotóxica, sugirieron que las citoquinas IL-17 son necesarias para el surgimiento de una respuesta T CD8+ específica robusta, necesaria para limitar las cantidades de parásito en tejido.

Con objetivo de profundizar estos conocimientos, se prosiguió a caracterizar la respuesta de LiT CD8+ específicos en la progresión de la infección. En suspensiones celulares de bazo de ratones WT e IL-17RA KO a diferentes días pi (0, 10, 13, 21, 31 y 90), se evaluó el porcentaje y número absoluto de LiT CD8+ TSKB20/Kb+. Como se observa en la figura 29A-B, los ratones WT mostraron una cinética de respuesta T CD8+ específica que siguió al patrón típico de respuesta definido para infecciones modelo como las del virus de la linfocoriomeningitis murina (LCMV) y la bacteria *Listeria monocytogenes* (revisado en Doherty y Cristensen [254]). Acompañando a la cinética de parasitemia, la frecuencia y número absoluto de LiT CD8+ específicos para TSKB20, atravesaron las fases clásicamente definidas (activación, expansión y contracción). Así, hasta el día 10 pi, periodo de tiempo en los cuales la infección cursa con parasitemia indetectable, se encontró una nula o apenas detectable frecuencia de LiTCD8+ específicos

para TSKB20. Este hallazgo es compatible con la fase de iniciación de la respuesta donde ocurren los fenómenos de presentación antigénica y activación clonal. Entre los días 10 y 32 pi y coincidentemente con los altos valores de parasitemia en sangre, se observó una fase de expansión clonal. Durante la misma, se observó un marcado incremento de la frecuencia y número absoluto de LiTCD8+ TSKB20/Kb+. Finalmente, a partir del día 32 y cuando la carga parasitaria estaba controlada, se observó un comportamiento compatible con una fase de contracción de la respuesta y generación de memoria. Esto fue evidenciado por la reducción masiva del porcentaje de LiT CD8+ específicos para TSKB20 y el mantenimiento de un pequeño porcentaje de estas células, posiblemente células de memoria, hasta periodos avanzados de infección (día 90 pi).

En contraste, los ratones IL-17RA KO mostraron un patrón de respuesta diferente: Si bien hasta alrededor del día 14 pi la cantidad de LiT CD8+ específicos fue similar a las de sus controles WT, éstos disminuyeron precipitadamente a partir del día 14 pi (figuras 29A y B). Estos resultados demostraron que durante la infección la ausencia de IL-17RA no repercute en la iniciación de la respuesta, pero si compromete su expansión/sostenimiento. Asimismo, los animales IL-17RA KO presentaron disminuida cantidad de LiT CD8+ totales al día 21 de infección (figura 29C), sugiriendo que el fenómeno podría ser extensivo a otras especificidades que en conjunto afectan significativamente la cantidad de LiT CD8+ hacia el día pico de la infección.

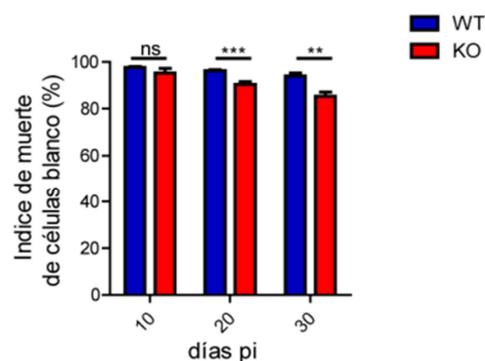


**Figura 29. La ausencia de señalización de las citoquinas IL-17 en la infección con *T. cruzi* provoca la contracción prematura de la respuesta de linfocitos T CD8+.** A) Porcentaje y B) número de LiT CD8+ TSKB20/Kb+, y C) número de LiT CD8+ totales determinados en bazo de ratones WT (azul) e IL-17RA KO (rojo) a diferentes tiempos de infección con *T. cruzi*. Los datos se muestran como media  $\pm$  DE, n=5-8 ratones por grupo. Los valores de p fueron calculados usando ANOVA de dos vías seguido del Test de Bonferroni (\*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001). Los resultados son representativos de cinco experimentos independientes.

Considerando el hecho de que no sólo la cantidad de células sino también su funcionalidad es indicativa del estado de las respuestas de los LiT CD8+ [255], se propuso evaluar la capacidad citotóxica *in vivo* en ambos grupos de ratones infectados. Para ello, se obtuvieron células de bazo de ratones WT normales y se dividieron en dos fracciones: Una de ellas se incubó con el péptido TSKB20 y se tiñó con altas concentraciones de CFSE (células “blanco”); mientras que la otra se incubó en ausencia del péptido y se tiñó con bajas concentraciones de CFSE (células “control”). Posteriormente, iguales cantidades de las células “blanco” y “control” se inyectaron conjuntamente en ratones WT e IL-17RA KO no infectados, o en los mismos grupos pero a los 10, 20

y 30 días pi. Luego de 18 h desde la transferencia, los animales fueron sacrificados, se determinó por citometría de flujo la frecuencia de células “blanco” (CFSE alto) y “control” (CFSE bajo) en bazo, y se calculó el porcentaje de citotoxicidad o el índice de muerte de células “blanco”. Al día 10 pi cuando la frecuencia de LiT CD8+ específicos era similar entre ambas cepas (figuras 28 y 29), el porcentaje de citotoxicidad de los animales IL-17RA KO infectados fue también similar al de los WT. En contraste, a tiempos posteriores (día 20 y 30 pi) cuando los animales IL-17RA KO presentaban reducida frecuencia de LiT CD8+ específicos (figuras 28 y 29), mostraron al mismo tiempo una reducida capacidad citotóxica (figura 30). Estos resultados indicaron que en la infección con *T. cruzi* la ausencia de IL-17RA no sólo compromete a partir del día 20 la magnitud de LiT CD8+ específicos pi, sino que, consecuentemente, también disminuye su capacidad efectora *in vivo*.

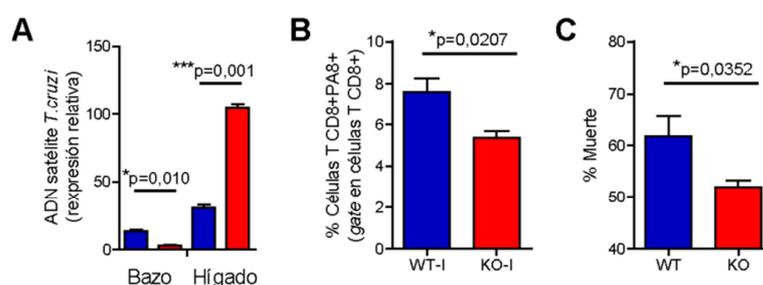
Para determinar si estos hallazgos eran extensivos a la infección con otra cepa del *T. cruzi* y para otra especificidad, se repitieron los mismos estudios pero ahora en animales infectados con la cepa Y. Es relevante mencionar que esta última presenta características diferentes a la cepa Tulahuén: es menos virulenta, cursa con cinéticas de parasitemia y respuestas T CD8+ específicas demoradas, y genera



**Figura 30. Los ratones IL-17RA infectados con *T. cruzi* exhiben una disminuida actividad citotóxica *in vivo*.** Actividad citotóxica *in vivo* frente a células blanco pulsadas con TSKB20 determinada en bazo de ratones WT e IL-17RA KO a diferentes días de infección con *T. cruzi*. Los resultados son expresados como la media del índice de muerte de células “blanco” (células pulsadas con el péptido TSKB20)  $\pm$  DE, n=4 ratones/grupo. Los valores de p fueron calculados utilizando Test-T de dos colas. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

inmunodominancia para PA8 [126, 253]. En consecuencia, cuando se utilizó esta cepa de ratones la infección se efectuó con más parásitos, los estudios se realizaron a tiempos más avanzados de infección, y los LiT CD8<sup>+</sup> se evaluaron con tetrámeros PA8/Kb. Entonces, animales WT e IL-17RA KO fueron inoculados con 10.000 tripomastigotes de la cepa Y, y estudiados al día 28 pi. En bazo e hígado de estos animales, se evaluaron tanto la carga parasitaria, como las frecuencias de LiT CD8<sup>+</sup> específicos para PA8 y su capacidad citotóxica *in vivo*. De manera similar a los resultados encontrados para TSKB20 en experimentos que utilizaron la cepa Tulahuén, los ratones IL-17RA KO infectados con la cepa Y presentaron mayor carga parasitaria en tejido (figura 31A) y menor frecuencia de LiT CD8<sup>+</sup> específicos para PA8 que los animales WT (figura 31 B). Además, y de acuerdo con la menor frecuencia de LiT CD8<sup>+</sup> específicos, la citotoxicidad *in vivo* de células pulsadas con PA8 fue menor en animales IL-17RA KO que en su contraparte WT (figura 31C).

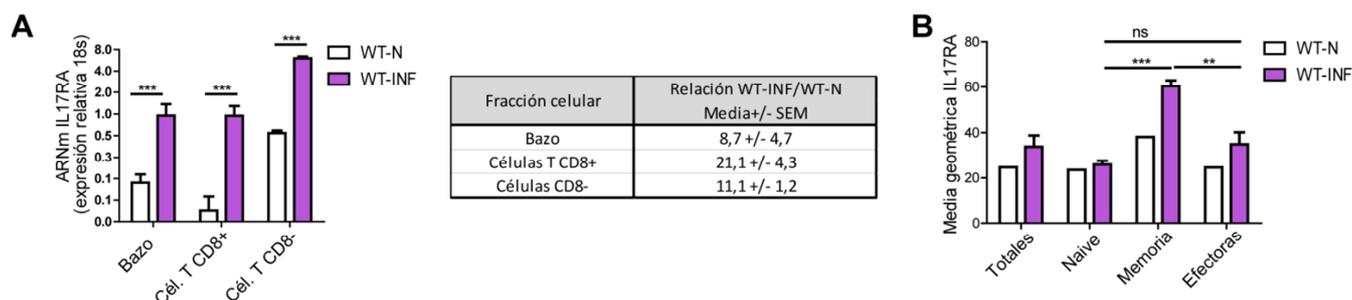
En conjunto estos resultados indicaron que durante la infección con *T. cruzi* la señalización a través de IL-17RA es requerida para sostener la magnitud de la respuesta de LiT CD8<sup>+</sup> específicos para el parásito y una eficiente respuesta citotóxica *in vivo*.



**Figura 31. Los animales IL-17RA KO infectados con la cepa Y de *T. cruzi* exhiben una reducida magnitud de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos.** Ratones WT (azul) e IL-17RA KO (rojo) inoculados con 10.000 tripomastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* y analizados al día 28 post- infección. **A)** Cantidad de ADN satélite de *T. cruzi* relativa a GAPDH determinada en bazo e hígado. **B)** Porcentaje de LiT CD8<sup>+</sup> PA8/Kb<sup>+</sup> en suspensiones celulares de bazo. Los resultados en **A-B)** se muestran como el valor promedio obtenido de 5 ratones  $\pm$  DE. Los valores de p fueron calculados con test-T de dos colas. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. **C)** Actividad citotóxica *in vivo* frente a células blanco pulsadas con PA8. Los resultados son expresados como la media del índice de muerte de células "blanco" (células pulsadas con el péptido PA8)  $\pm$  DE, n=4 ratones/grupo. Los valores de p fueron calculados utilizando test-T de dos colas. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

### **IL-17RA promueve el mantenimiento de los linfocitos T CD8+ activados durante la infección con *T. cruzi* a través de un mecanismo de señalización intrínseco**

Se ha reportado que IL-17RA se expresa de forma ubicua en diversas poblaciones celulares y presenta niveles particularmente altos en tejidos hematopoyéticos [162]. Particularmente, se ha descrito que los LiT CD8+ expresan constitutivamente IL-17RA y también que, citoquinas implicadas en el desarrollo de LiT CD8+ (tales como IL-21) inducen la expresión de dicho receptor (revisado en Gaffen [147]). En este contexto, se planteó la posibilidad de que los fenómenos observados durante la infección en animales IL-17RA involucraran un mecanismo intrínseco a los LiT CD8+; es decir, dependientes de la expresión y señalización de IL-17RA en los mismos LiT CD8+. Con el objetivo de explorar esta alternativa, se determinó mediante PCR cuantitativa la cantidad de ARNm que codifica para IL-17RA en tejido total o diferentes poblaciones celulares (LiT CD8-: CD3+CD8- y LiT CD8+: CD3+CD8-) purificadas por cell sorting del bazo de ratones WT no infectados o infectados con *T. cruzi* (día 20 pi). De acuerdo con los datos publicados, se detectó ARNm para IL-17RA en tejido total, así como en células CD3+CD8- y CD3+CD8+ de bazo de ratones no infectados (figura 32A). Además, la infección con *T. cruzi* indujo un incremento significativo de IL-17RA (figura 32A) en todos los casos analizados y particularmente en los LiT CD8+. Para corroborar que aquello observado a nivel de expresión génica tuviera su correlato a nivel proteico, se cuantificó a IL-17RA por citometría de flujo. Suspensiones celulares de bazo de ratones WT no infectados o al día 22 pi fueron estudiadas por citometría de flujo para evaluar la expresión de IL-17RA en poblaciones definidas por diversos marcadores de superficie. De similar forma que lo observado a nivel de ARN, los LiT CD8+ totales expresaron IL-17RA de forma basal y la infección incrementó dicha expresión. Tomando en consideración que muchos de los fenómenos que involucran a la biología de los LiT CD8+ cambian sustancialmente en relación a su estado de activación, se analizó la expresión de IL-17RA en subpoblaciones celulares. La activación de los LiT desencadena modificaciones funcionales y fenotípicas que resultan en la diferenciación de tres subpoblaciones: *naive* o vírgenes (que no contactaron con el antígeno), efectoras (que contactaron con el antígeno y poseen alta capacidad efectora pero baja capacidad de proliferación); y de memoria central (que contactaron con el antígeno y adquirieron algunas capacidades efectoras y alta capacidad de auto-renovación). Estas tres subpoblaciones son identificadas en ratón en base a la expresión de los marcadores CD62L y CD44: las células *naive* presentan un fenotipo CD62L<sup>alto</sup>CD44<sup>bajo</sup>; las que tienen un



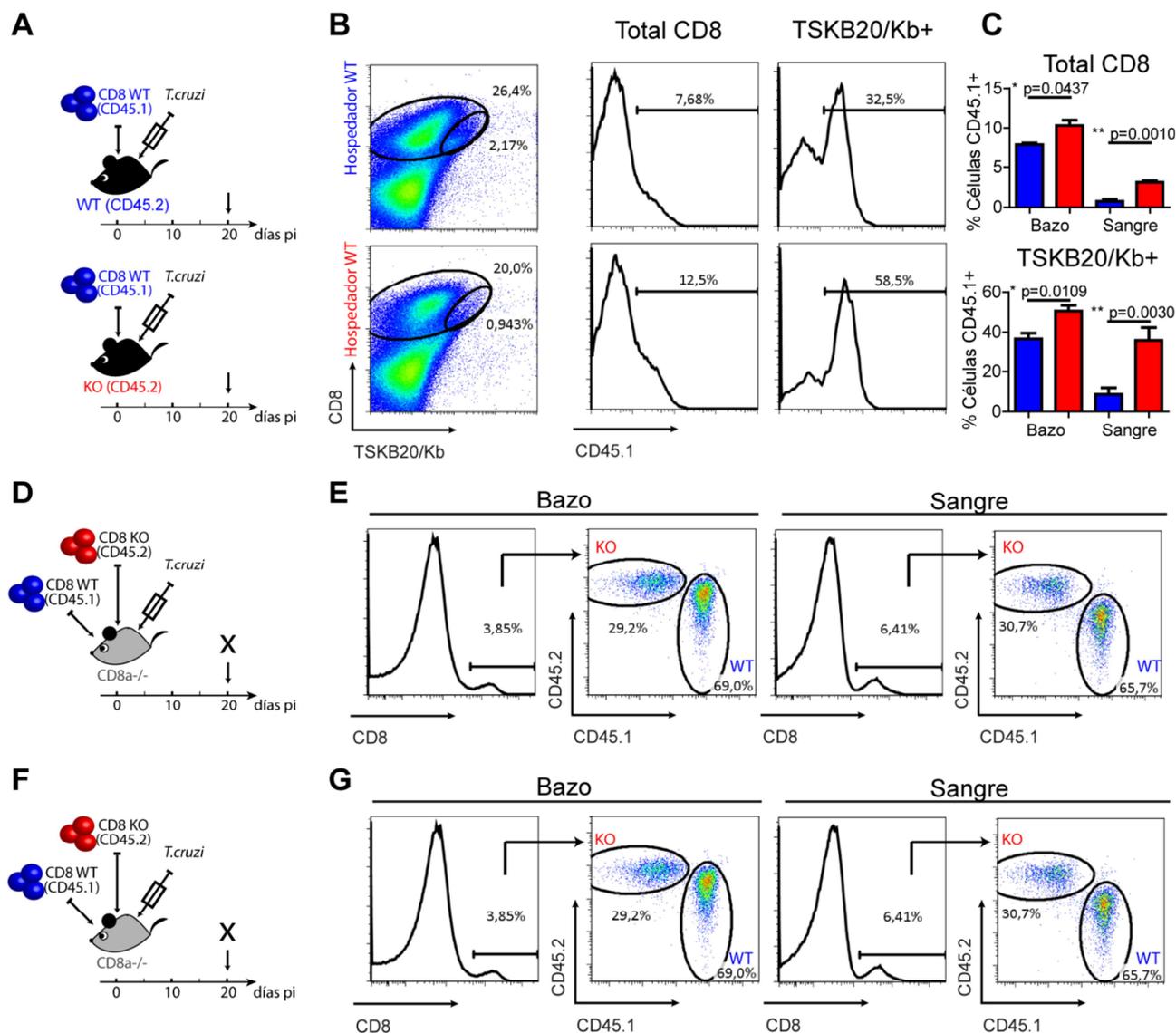
**Figura 32. La infección con *T. cruzi* induce la expresión de IL-17RA en los linfocitos T CD8+.** **A)** Cantidades ARNm que codifica para IL-17RA determinadas por PCR cuantitativa en bazo y esplenocitos CD8+CD3+ y CD8- provenientes de ratones no infectados (blanco) o de ratones infectados con *T. cruzi*, al día 15 pi (violeta). Las cantidades de ARN 18S se utilizaron para la normalización. Los datos se muestran como media + DE, n = 3. La estadística se determinó con test-T de dos colas (\*\*p<0.001). **B)** Expresión de IL-17RA determinada por citometría de flujo en LiT CD8+ totales, vírgenes o *naive* (CD62L+CD44-), memoria (CD62L+CD44+) Y efectores (CD62L-CD44+) provenienteS de ratones no infectados (blanco) o de ratones infectados con *T. cruzi* al día 22 pi (violeta). Las diferencias de expresión de IL-17RA entre las distintas subpoblaciones T CD8+ de animales infectados fue calculada con test-T de dos colas apareado (\*\*p<0.001, \*\*p=0.0010, ns= no significativo). Los resultados en **A-B** son representativos de dos experimentos independientes.

perfil efector/activado expresan CD62L<sup>bajo</sup>CD44<sup>alto</sup>; y las células de memoria se caracterizan por ser CD62L<sup>alto</sup>CD44<sup>alto</sup> [255]. Los resultados de la figura 32B evidencian que, si bien todas las subpoblaciones de LiT CD8+ expresan IL-17RA de forma basal, el aumento suscitado por la infección acontece en las células efectoras y particularmente de memoria. Estos datos indicarían que las citoquinas de la familia IL-17 pueden regular directamente a los LiT CD8+ y que su potencial efecto durante la infección con *T. cruzi* sería más pronunciado en LiT CD8+ efectores y de memoria.

En segundo lugar y con motivo de evaluar cómo la señalización de IL-17RA intrínseca a los LiT CD8+ totales impactaba en la respuesta frente a la infección con *T. cruzi*, se realizaron distintos ensayos de transferencia adoptiva. De forma convencional para estos experimentos, se tomó ventaja de la existencia de cepas congénicas, las cuales expresan CD45.1 y CD45.2 como marcadores genéticos que no confieren características distintivas a las células que los expresan pero permiten identificar el origen celular por citometría de flujo. En un primer ensayo, LiT CD8+ totales fueron purificados por selección negativa con perlas magnéticas del bazo de ratones WT no infectados que expresaban el marcador CD45.1. Estas células fueron inyectadas de forma endovenosa en hospedadores WT e IL-17RA KO que expresaban el marcador CD45.2 (figura 33A). De manera simultánea a la transferencia, los ratones hospedadores fueron infectados con *T. cruzi*. Luego de 20 días de infección se evaluó por citometría de

flujo, la proporción de LiT transferidos identificadas por la expresión de CD45.1 dentro del conjunto de LiT CD8+ totales y específicos para TSKB20. En bazo de los ratones WT infectados, los LiT CD8+ WT exógenos (CD45.1+) representaron alrededor del 8% de los LiT CD8+ totales y cerca del 30% de los específicos (figura 33B, C). Por otro lado, la contribución de los LiT CD8+ exógenos (WT CD45.1+) en el hospedador IL-17RA KO infectado fue significativamente mayor, llegando a conformar alrededor del 12% de los LiT CD8+ totales y 60% de los específicos. Resultados similares fueron obtenidos también en sangre de estos ratones (figura 33C). De este modo, estos resultados evidenciaron que los LiT CD8+ inyectados se encuentran mayormente representados en los hospedadores IL-17RA KO infectados, donde los LiT CD8+ endógenos carecen de la expresión de IL-17RA. Estos hallazgos sugirieron que la señalización intrínseca de IL-17RA en el Li TCD8+ durante la infección con *T. cruzi* confiere ventajas en la supervivencia o proliferación.

Sin embargo, como en estos experimentos la transferencia se efectuó en hospedadores distintos, era posible que otras condiciones como los niveles de citoquinas pro-inflamatorias o el parasitismo tisular operaran sobre los LiT CD8+ transferidos y condicionaran su expansión/acumulación. Por ello, se diseñó un segundo ensayo de transferencia adoptiva, en este caso competitivo, que consistió en la inyección de LiT CD8+ WT e IL-17RA KO en el mismo hospedador. Entonces, se transfirieron de manera conjunta cantidades iguales de LiT CD8+ WT (CD45.1+) y LiT CD8+ IL-17RA KO (CD45.2+) en ratones hospedadores WT F1 CD45.1+/CD45.2+ (nacidos de la primera cruce de ratones WT CD45.1 y WT CD45.2); e inmediatamente después se infectaron con *T. cruzi*. Luego de 20 días de infección, se examinó la contribución de las células exógenas a la población total de LiT CD8+ (figura 33D). Como era de esperarse, los LiT CD8+ endógenos, caracterizadas como CD45.1+CD45.2+ dominaron la respuesta de LiT CD8+ (figura 33E). Sin embargo, en la pequeña población exógena que respondió a la infección (identificada por la expresión simple positiva de CD45.1 o CD45.2), la frecuencia de células WT CD45.1+ fue mayor a la frecuencia de células IL-17RA KO CD45.2+ en todos los órganos examinados, a saber: bazo, sangre (figura 33E) e hígado (datos no mostrados).



**Figura 33. Los LiT CD8+ que expresan IL-17RA se acumulan preferencialmente durante la infección con *T. cruzi*.** A-C) Transferencia adoptiva de LiT CD8+ purificados de ratones WT congénicos CD45.1 en hospedadores CD45.2 WT e IL-17RA KO, seguida de la infección inmediata con *T. cruzi*. **A)** Esquema experimental. **B)** Porcentaje de LiT CD8+ totales y específicos para TSKB20 y (al interior de los mismos), frecuencia de células exógenas CD45.1, en el bazo de ratones hospedadores WT (arriba) y KO (abajo), al día 20 pi. En cada grupo se muestran gráficos de un animal representativo de 5. **C)** Porcentaje de células inyectadas CD45.1+ en las poblaciones indicadas, en bazo y sangre de ratones hospedadores WT (azul) e IL-17RA KO (rojo). Se muestra el promedio + DE, de 4 ratones por grupo. Los valores de p fueron calculados con Test-T de dos colas. Los resultados en B-C son representativos de dos experimentos independientes. D-E) Transferencia adoptiva de igual número de LiT CD8+ purificados de ratones WT CD45.1 y ratones IL-17RA KO CD45.2 en ratones receptores F1 CD45.1/CD45.2 WT, seguido de la infección con *T. cruzi*. **D)** Esquema experimental **E)** Porcentaje de LiT CD8+ totales y frecuencia de células CD45.1+ y CD45.2+ en la población T CD8+ de bazo (izquierda) y sangre (derecha) de ratones receptores después de 20 días de la infección. Se muestran gráficos de un animal representativo de 5. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes. F-G) Transferencia adoptiva de igual número de LiT CD8+ purificados de ratones WT CD45.1 y ratones IL-17RA KO CD45.2 en ratones receptores CD8-/-, seguido de la infección con *T. cruzi*. **F)** Esquema experimental. **G)** Porcentaje de LiT CD8+ totales y frecuencia de células CD45.1+ y CD45.2+ en la población T CD8+ de bazo (izquierda) y sangre (derecha) en los ratones receptores después de 15 días de la infección. Se muestran gráficos de un animal representativo de 3. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

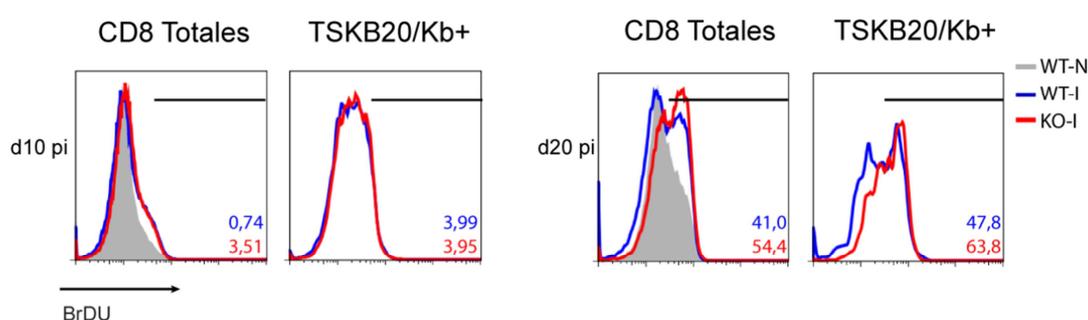
Finalmente, se diseñó un tercer experimento de transferencia para descartar la posibilidad de que las células endógenas, que constituían la población mayoritaria en los dos experimentos anteriores, estuviesen influenciando la expansión/sostenimiento diferencial de las células exógenas. El mismo consistió también en un ensayo competitivo donde los LiT CD8+ WT (CD45.1) e IL-17RA KO (CD45.2) fueron transferidos conjuntamente en iguales cantidades en un hospedador deficiente en CD8a (CD8<sup>-/-</sup>), que carecía de la población de LiT CD8+ endógenos. Una salvedad a tener en cuenta es que los estudios en estos animales se hicieron al día 15 pi debido a que su extrema susceptibilidad [126], incluso luego de la transferencia de LiT CD8+ exógenos, impidieron estudios a tiempos posteriores (figura 33F). Entonces, las frecuencias de LiT CD8+ WT (CD45.1) e IL-17RA KO (CD45.2) fueron evaluadas en suspensiones celulares de bazo, hígado y sangre por citometría de flujo. Como se observa en la figura 33G la frecuencia de LiT CD8+ WT fue mayor a la frecuencia de los LiT CD8+ deficientes en IL-17RA, en todos los órganos estudiados.

En conjunto, estos hallazgos indicaron que en contexto de la infección con *T. cruzi*, las citoquinas que señalizan a través de IL-17RA actúan directamente sobre la célula T CD8+ (a través de un mecanismo intrínseco) favoreciendo su expansión y/o supervivencia. Es importante mencionar que en estos experimentos los análisis se limitaron a establecer la frecuencia de LiT CD8+ totales y no avanzaron en la caracterización de los LiT CD8+ específicos para TSKB20, debido a que el número de células transferidas era muy reducido para hacer este tipo de determinaciones.

### **La señalización a través de IL-17RA durante la infección con *T. cruzi* sostiene la supervivencia de los linfocitos T CD8+ totales y específicos**

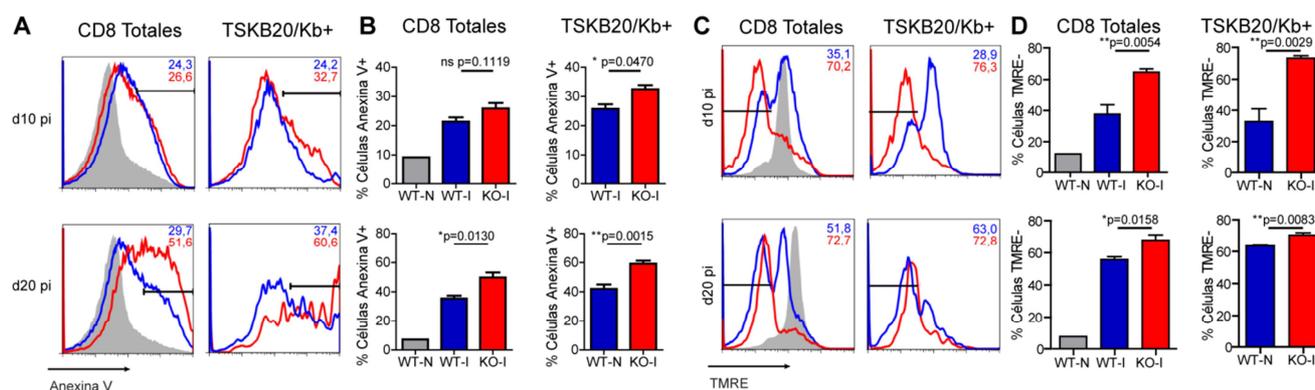
La disminución en la frecuencia de LiT se manifiesta usualmente como consecuencia de una reducida proliferación o bien de una disminuida viabilidad celular [120]. Teniendo en cuenta que tanto una como otra, e incluso ambas opciones en simultáneo, eran factibles en el caso de la reducida magnitud de respuesta de LiT CD8+ de animales IL-17RA KO; se realizaron experimentos orientados a dilucidar cuál de ellas estaba involucrada.

Para evaluar si en los animales IL-17RA KO estaba comprometida la proliferación o expansión de los LiT CD8+ durante la infección con *T. cruzi*, se realizaron experimentos *in vivo* de incorporación de Bromo-Deoxi-Uridina (BrDU). Cinco días previos a su análisis, se suministró BrDU (un análogo halogenado de la timidina) a animales WT e IL-17RA KO infectados. De esta forma, las células que proliferaron durante ese tiempo, sintetizaron ADN e incorporaron consecuentemente BrDU. El porcentaje de células BrDU+ se determinó por citometría de flujo en suspensiones celulares de bazo de ambos grupos de animales infectados a los 10 y 20 días de infección, períodos que preceden y suceden a la precipitada reducción del número de LiT CD8+ específicos en ratones IL-17RA KO infectados. Luego de 10 días de infección, se observó una limitada incorporación de BrDU en los LiT CD8+ de ratones WT como IL-17RA KO infectados, y la frecuencia de células BrDU+ dentro de la población de LiT CD8+ totales y específicos para TSKB20 no mostró diferencias significativas entre ambos grupos de ratones (figura 34). En cambio, al día 20 pi, todos los animales presentaron mayor frecuencia de células en proliferación. Sorprendentemente, los LiT CD8+ totales y específicos para TSKB20 de ratones IL-17RA KO infectados, mostraron un porcentaje ligeramente mayor de células BrDU+ que sus contrapartes WT (figura 34). En lo que respecta a estos estudios, los resultados aquí obtenidos indicaron que la ausencia de IL-17RA no compromete la expansión de los LiT CD8+ totales ni específicos para TSKB20 durante la infección con *T. cruzi*.



**Figura 34. La ausencia de IL-17RA no compromete la proliferación de LiT CD8+ en la infección con *T. cruzi*.** Tinción con BrDU de LiT CD8+ totales y TSKB20/Kb+ de bazo de ratones WT (azul) e IL-17RA KO (rojo) a los días 10 pi (Izquierda) y 20 pi (derecha) con *T. cruzi*. El histograma gris muestra la tinción en LiT CD8+ de ratones WT no infectados. Los histogramas mostrados corresponden a un pool de 5 ratones por grupo. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

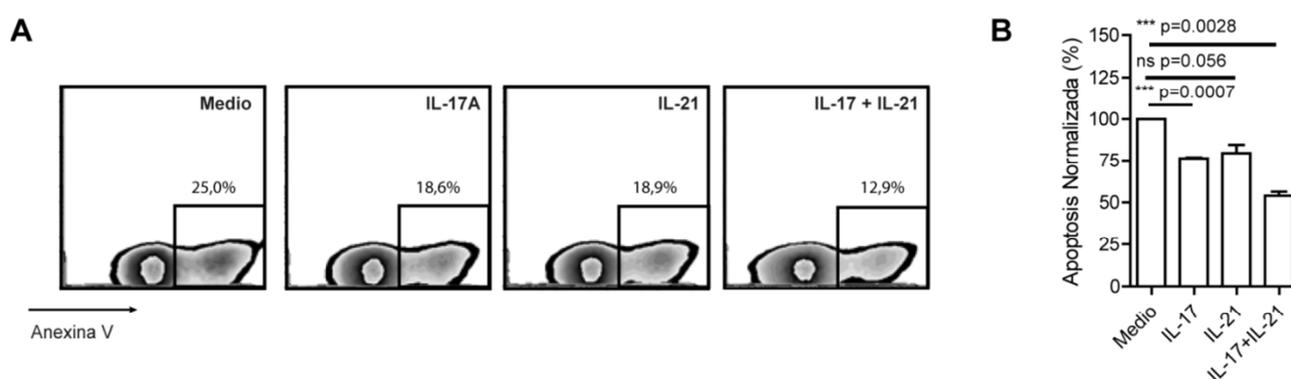
Se prosiguió a evaluar entonces el posible papel de la señalización a través de IL-17RA en el mantenimiento o supervivencia de los LiT CD8+. En primer lugar, la viabilidad celular fue estudiada a través de la determinación de apoptosis en esplenocitos de animales WT e IL-17RA KO infectados (día 10 y 20 pi) mediante la tinción con anexina V y el colorante 7-amino-actinomicina D (7-AAD). Las células en apoptosis se determinaron como aquellas que unieron anexina V dentro de la población que excluyó 7-AAD (que incluía a todas las células excepto las necróticas). Los ratones IL-17RA KO infectados presentaron un porcentaje significativamente mayor de apoptosis en LiT CD8+ específicos para TSKB20 que sus contrapartes WT, tanto a tiempos tempranos de infección (día 10 pi) como en momentos posteriores donde el fenómeno fue incluso más pronunciado (figuras 35A y B). Así mismo, los LiT CD8+ totales de ratones IL-17RA KO infectados también mostraron un mayor porcentaje de apoptosis pero recién a los 20 días de infección. Con objetivo de reforzar estos hallazgos, se estudió la viabilidad celular a través de ensayos que determinaron el potencial de membrana mitocondrial. Para ello se utilizó el compuesto fluorescente éster etílico tetrametilrodamina (TMRE), que se acumula en



**Figura 35. Los LiT CD8+ de animales IL-17RA KO infectados con *T. cruzi* muestran incrementada apoptosis. A)** Tinción con anexina V de LiT CD8+ totales y TSKB20/Kb+ en un *gate* 7AAD- en suspensiones celulares de bazo de ratones WT (azul) e IL-17RA KO (rojo) a los días 10 (arriba) y 20 (abajo) pi con *T. cruzi*. El histograma gris muestra la tinción en LiT CD8+ de ratones WT no infectados. Los números indican el % de Anexina V+ y el color es indicativo del grupo. **B)** Análisis estadístico de los datos obtenidos en A. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE, n = 5 ratones, los valores de p fueron calculados con test-T de dos colas. **C)** Tinción con TMRE de LiT CD8+ totales y TSKB20/Kb+ de suspensiones celulares bazo de ratones WT (azul) e IL-17RA KO (rojo) a los días 10 (arriba) y 20 (abajo) pi con *T. cruzi*. El análisis se realizó excluyendo previamente las células muertas (nula expresión de TMRE). El histograma gris muestra la tinción en LiT CD8+ de ratones WT no infectados. Los números indican el % de TMRE-bajo y el color es indicativo del grupo. **D)** Análisis estadístico de los datos obtenidos en C. Los datos se presentan como media  $\pm$  DE, n = 5 ratones, los valores de p fueron calculados con test-T de dos colas. Los resultados **A-B** y **C-D** son representativos de tres y dos experimentos independientes.

mitocondrias de las células viables que mantienen su potencial de membrana (TMRE+) pero no así en células apoptóticas o necróticas (TMRE<sup>bajo</sup> o TMRE-). Suspensiones celulares de bazo de ratones WT e IL-17RA KO a los 10 y 20 días pi, previamente teñidas con anticuerpos anti-CD8 y TSKB20/Kb, fueron incubadas con TMRE y analizadas por citometría de flujo. Tras la exclusión de las células con nula capacidad de secuestrar TMRE (TMRE-), se identificaron como apoptóticas a las células que mostraron débil marca del mismo (TMRE<sup>bajo</sup>). En ambos tiempos de infección analizados, los LiT CD8+ totales y específicos para TSKB20 de ratones IL-17RA KO exhibieron mayor porcentaje de células apoptóticas o TMRE<sup>bajo</sup> (figuras 35C y D). En resumen, estos resultados demostraron que durante la infección con *T. cruzi* la ausencia de IL-17RA promueve una prematura y masiva muerte celular programada de los LiT CD8+ totales y particularmente de los específicos, lo que provoca la contracción prematura de la respuesta citotóxica.

Considerando estos resultados y aquellos que mostraron que las citoquinas de la familia IL-17 ejercían un efecto directo sobre IL-17RA de los LiT CD8+, se propuso evaluar el efecto de IL-17 en la supervivencia de LiT CD8+ activados *in vitro*. Se destaca que estos primeros estudios se focalizaron en IL-17A, como la citoquina más caracterizada de la familia, conocida por su participación en muchos fenómenos inmunológicos de distinto tipo (infecciones, patologías autoinmunes, entre otros). Además, se utilizó IL-21, citoquina que induce la supervivencia de LiT CD8+ [256], como control positivo. Entonces, se



**Figura 36. La presencia de IL-17A en los cultivos disminuye la apoptosis de linfocitos T CD8+ activados *in vitro*.** Tinción con anexina V de LiT CD8+ totales purificados con perlas magnéticas por selección negativa de bazo de ratones WT no infectados, cultivadas durante 48 h con aCD3/aCD28 en presencia o ausencia IL-17A recombinante (100ng/mL [187]) y/o IL-21 (50ng/mL [257]). **A)** Unión de Anexina V en suspensiones de células que excluyen 7AAD (no necróticas). Histogramas representativos de 3 *pools* de 3 ratones cada uno. **B)** Análisis estadístico de los datos obtenidos en A. Los valores que se muestran se encuentran normalizados respecto al cultivo con medio. Los valores de p fueron calculados con test-T apareado de dos colas. Los resultados **A-B** son representativos de dos experimentos independientes.

purificaron con perlas magnéticas LiT CD8+ de bazo de ratones WT no infectados y se los cultivó durante 24 h con anti-CD3 y anti-CD28, en ausencia o presencia de IL-17A y/o IL-21 recombinante. La apoptosis de las células fue posteriormente evaluada con anexina V y 7-AAD. Como se aprecia en la figura 36, la presencia de IL-17A recombinante en los cultivos disminuyó significativamente el porcentaje de apoptosis de los LiT CD8+ activados (figura 36A y B). Cabe destacar que la reducción de la apoptosis desencadenada por IL-17A fue similar a la acontecida en los cultivos con IL-21, y que la presencia de ambas citoquinas mostró un efecto aún más pronunciado. Estos resultados permitieron aproximar que IL-17A, independientemente de la infección con *T. cruzi*, está involucrada directamente en el sostenimiento de la sobrevivencia de LiT CD8+ y podría actuar de forma sinérgica con IL-21. Los resultados aquí obtenidos, aunque muy preliminares, disparan muchos interrogantes que incluso exceden a la infección con *T. cruzi* y son actualmente un campo activo de investigación del grupo de trabajo.

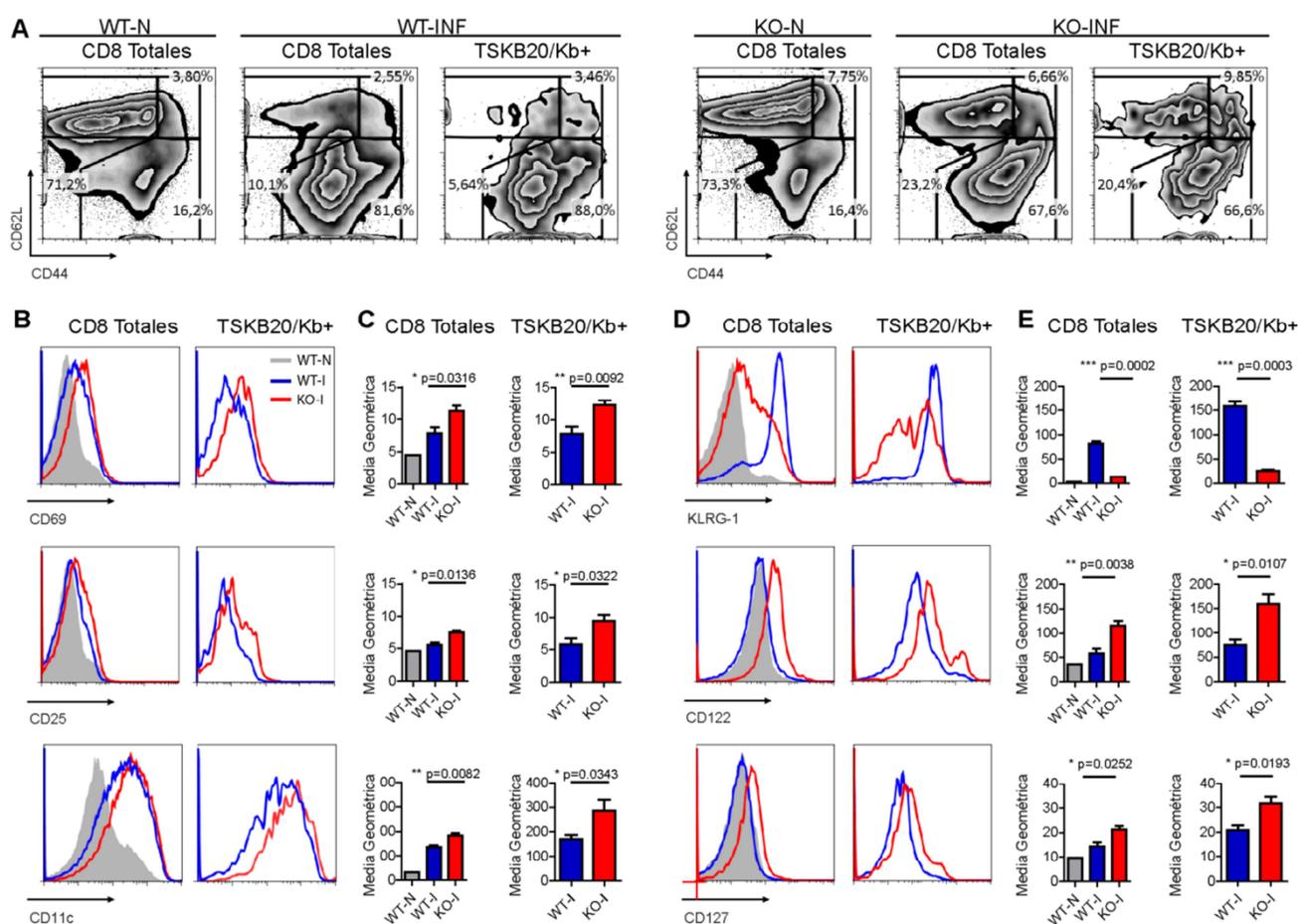
En conjunto, los resultados mostrados en esta sección indican que citoquinas IL-17 sostienen la frecuencia de LiT CD8+ en contexto de la infección *T. cruzi*, regulando directamente la sobrevivencia de los mismos más que su expansión. El rol de IL-17RA en las distintas subpoblaciones de LiT CD8+ durante la infección y el efecto de IL-17A sobre las señales intracelulares que sostienen la sobrevivencia de los LiT CD8+ no infectados activados *in vitro*, requiere de estudios más profundos y específicos.

### **Las citoquinas de la familia IL-17 influyen en la activación y diferenciación de los linfocitos T CD8+ durante la infección con *T. cruzi***

Se ha propuesto que la regulación de la diferenciación de LiT CD8+ entre efectores de corta vida y memoria de larga vida sería un mecanismo natural para modular la contracción de la respuesta citotóxica y, por consiguiente, su magnitud y persistencia [258, 259]. Además, algunos reportes dan cuenta que en contextos altamente inflamatorios y con el objetivo de responder rápidamente a la injuria, se potencia la diferenciación de LiT CD8+ a efectores de corta vida; mientras que al mismo tiempo se compromete la aparición de precursores de memoria capaces de sostener una respuesta inmune de larga vida [260-263]. Teniendo en cuenta que ratones IL-17RA KO infectados presentan de manera característica mayor inflamación que ratones WT, se propuso determinar si la ausencia de

señalización a través de IL-17RA acelera la contracción de la respuesta T CD8+ antígeno específica mediante la inducción preferencial de un perfil efector de corta vida.

En primer lugar se estudió la expresión de distintas moléculas de superficie que caracterizan la



**Figura 37. La deficiencia de IL-17RA durante la infección con *T. cruzi* altera la activación y diferenciación de linfocitos T CD8+.** Ratones WT e IL-17RA KO fueron infectados con *T. cruzi* y 20 días después se sacrificaron y purificaron esplenocitos totales. A los mismos se les realizó una tinción ex vivo con anticuerpos anti-CD8, tetrámero TSKB20/Kb y anticuerpos específicos indicados debajo de cada gráfico o histograma. Ratones WT no infectados (WT- NI) e IL-17RA KO no infectados (KO- N) se utilizaron como controles. **A)** Gráfico representativo de la expresión de CD44 y CD62L en LiT CD8+ totales y TSKB20/Kb+ en los diferentes grupos experimentales. **B)** Histogramas representativos y **C)** análisis estadístico de la media geométrica de expresión de marcadores de activación en el total de linfocitos T CD8+ (izquierda) o en los específicos para TSKB20 (derecha) en los diferentes grupos experimentales. **D)** Histogramas representativos y **E)** análisis estadístico de la media geométrica de expresión de marcadores de diferenciación en el total de LiT CD8+ (izquierda) o en los específicos para TSKB20 (derecha) en los diferentes grupos experimentales. Los datos en C y E se presentan como media  $\pm$  desviación estándar,  $n \geq 4$ . Los valores de p fueron calculados con Test-T de dos colas. Datos en A-E son representativos de al menos tres experimentos independientes.

activación celular. Para ello células de bazo de ratones WT e IL-17RA KO al día 20 pi fueron analizadas por citometría de flujo. La mayoría de los LiT CD8+ totales y específicos para TSKB20 de ratones WT mostraron una expresión de CD62L<sup>bajo</sup>CD44<sup>alto</sup>, compatible con un fenotipo efector/activado (figura 37A). Mientras tanto, los LiT CD8+ totales y específicos para TSKB20 de ratones IL-17RA KO mostraron con mayor frecuencia un fenotipo *naive* caracterizado por CD62L<sup>alto</sup>CD44<sup>bajo</sup> (figura 37A). A pesar de estos hallazgos, LiT CD8+ de animales IL-17RA KO presentaron un incremento significativo y uniforme en la expresión de otros marcadores de activación prototípicos tales como CD69, CD25 y CD11c, en comparación con LiT CD8+ de ratones WT (figuras 37B y C).

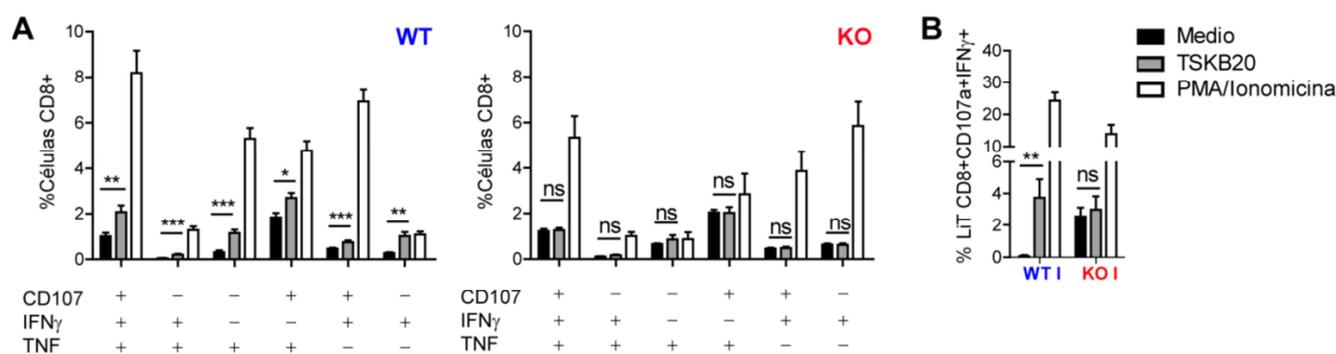
En segundo lugar, para definir específicamente si los LiT CD8+ de ratones IL-17RA KO y WT infectados mostraban un fenotipo de células efectoras de corta vida o de precursores de células de memoria, se evaluó la expresión de distintos marcadores que, de acuerdo a la literatura, se utilizan para definir estas poblaciones, como son: KLRG-1, CD127 y CD122. De acuerdo con reportes previos [130, 264], los LiT totales y específicos para TSKB20 de bazo de ratones WT a los 20 días de infección mostraron un fenotipo efector que se caracterizó por la alta expresión del marcador KLRG-1 y la baja expresión de los marcadores CD127 y CD122: KLRG-1<sup>alto</sup>CD127<sup>bajo</sup>CD122<sup>bajo</sup> (figuras 37D y E). En contraste, los LiT CD8+ de ratones IL-17RA KO infectados, mostraron menor expresión de KLRG-1 y mayor expresión de CD127 y CD122, fenotipo compatible con el de células precursoras de memoria.

En perspectiva, estos resultados indicaron que, si bien la señalización a través de IL-17RA no interviene en la capacidad de activación de los LiT CD8+ durante la infección con *T. cruzi*, si imprime características fenotípicas específicas en los LiT CD8+ que se diferencian en el contexto de la infección.

### **La señalización a través de IL-17RA durante la infección con *T. cruzi* previene el agotamiento de los linfocitos T CD8+.**

Para dilucidar si las características fenotípicas distintivas de los LiT CD8+ desarrolladas en ausencia de IL-17RA correlacionaban con alteraciones en la funcionalidad, se comparó la capacidad efectora *in vitro* de los LiT CD8+ de ratones IL-17RA KO infectados con la de su contraparte WT. La función efectora de los LiT CD8+ clásicamente se determina evaluando la expresión de CD107a (una molécula se expresa en la membrana celular luego la degranulación), y la producción intracelular de citoquinas que acontece

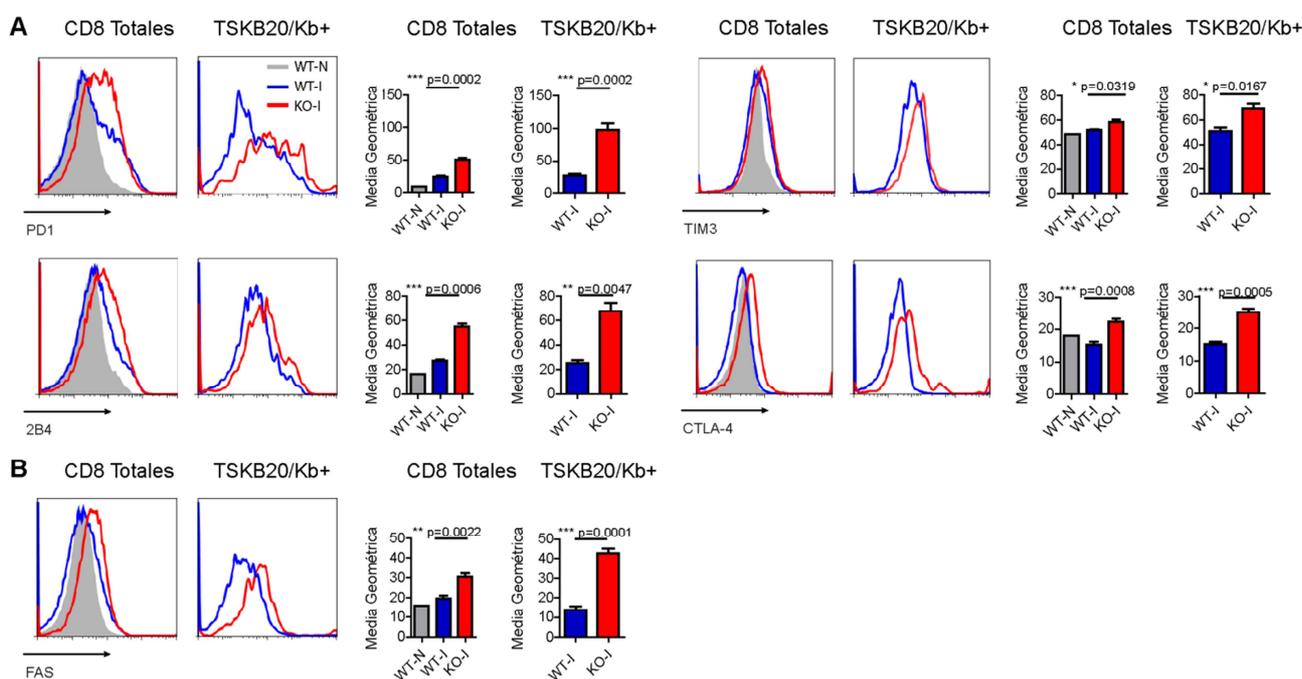
en respuesta a distintos estímulos (el antígeno específico y/o mitógenos). Además, se considera que la respuesta efectora es robusta si es polifuncional, es decir si los LiT CD8+ son capaces de responder al estímulo secretando sus gránulos líticos (expresando CD107a), y produciendo simultáneamente una o ambas citoquinas (generalmente IFN- $\gamma$  y/o TNF). Para evaluar la función de los LiT CD8+, los esplenocitos obtenidos de animales WT e IL-17RA KO al día 20 de infección fueron cultivados durante 5 h en presencia de monensina y anticuerpo anti-CD107a en ausencia de estímulo, o estimulados con el péptido parasitario TSKB20, o PMA/Ionomicina. Luego del cultivo se determinó por citometría de flujo la expresión de superficie de CD107a e intracelular de IFN- $\gamma$  y TNF. Como puede observarse en la figura 38A, respecto de la condición basal, los esplenocitos WT estimulados con TSKB20 mostraron un mayor porcentaje de LiT CD8+ polifuncionales (que expresaron CD107a en superficie y produjeron IFN- $\gamma$  y/o TNF). Si bien la magnitud de respuesta T CD8+ frente al péptido fue baja, resultó significativa respecto a los cultivos no estimulados y se mostró compatible con la frecuencia de LiT CD8+ específicos para TSKB20 detectada anteriormente mediante tetrámeros (figura 28 y 29). Considerando que los animales IL-17RA KO mostraron menor frecuencia de LiT CD8+ específicos (figura 28 y 29), se esperaba encontrar una menor respuesta efectora frente a TSKB20. Sin embargo, los LiT CD8+ de animales IL-17RA KO no respondieron en absoluto a la presencia del estímulo específico: Respecto de la condición



**Figura 38. La funcionalidad de los linfocitos CD8+ se encuentra disminuida en animales IL-17RA KO infectados con *T. cruzi*.** **A)** Porcentaje de LiT CD8+ de bazo de ratones WT (izquierda) e IL-17RA KO (derecha) infectado (día 20 pi) con *T. cruzi* (Tulahuén) que expresan CD107a, IFN- $\gamma$  y/o TNF frente a los estímulos indicados. Se muestra la media  $\pm$  DE, n = 5 ratones por grupo. Valores de p fueron calculados con Test-T de dos colas (ns: no significativo, \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001). **B)** Porcentaje de LiT CD8+ de bazo de ratones WT (izquierda) e IL-17RA KO (derecha) infectado (día 20 pi) con *T. cruzi* (cepa Y) que expresan CD107a, IFN- $\gamma$  y/o TNF frente a los estímulos indicados. Se muestra la media  $\pm$  DE, n = 5 ratones por grupo. Valores de p fueron calculados con Test-T de dos colas (ns: no significativo, \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001). Los resultados en **A** y **B** son representativos de tres y dos experimentos independientes.

basal, los esplenocitos IL-17RA KO estimulados con TSKB20 fueron incapaces de incrementar la movilización de CD107a y producción de IFN- $\gamma$  y/o TNF. Además, si bien frente al estímulo mitogénico se detectaron LiT CD8+ polifuncionales en los ratones IL-17RA KO infectados, la magnitud de esta respuesta fue menor que la observada en sus homólogos WT (figura 38A). Los resultados descriptos sugirieron que las citoquinas de la familia IL-17 en la infección con *T. cruzi*, además de sostener la frecuencia de los LiT CD8+ específicos para TSKB20, son importantes para propiciar una adecuada funcionalidad en respuesta al antígeno. Con el objetivo de probar que el fenómeno no se circunscribía a una cepa y a un antígeno en particular, se realizaron estudios semejantes en ratones infectados con la cepa Y de *T. cruzi*, pero ahora al día 28 pi. De forma similar a lo descrito con la cepa Tulahuén, se observó que los LiT CD8+ esplénicos de IL-17RA KO mostraron menor respuesta efectora polifuncional frente al péptido PA8 y al estímulo mitogénico que sus contrapartes WT (figura 38B). Estos resultados sugieren que el compromiso de la respuesta efectora en LiT CD8+ en ausencia de IL-17RA no depende de la cepa de parásitos o el antígeno evaluado.

Estudios recientes han establecido que en contextos de persistente exposición a antígenos o sostenida inflamación, los LiT CD8+ sufren una dramática alteración del perfil de activación que las condiciona a un estado de disfunción celular denominado agotamiento celular. Como se ha desarrollado en la introducción, esta condición se manifiesta en la pérdida progresiva y paulatina de las funciones efectoras; así como en una alta susceptibilidad a la apoptosis, incrementada y sostenida expresión de múltiples receptores inhibitorios, expresión alterada de factores de transcripción, y trastornos metabólicos, entre otros [132, 265]. En tal sentido era posible que el perfil de activación distintivo, la mayor apoptosis y los fuertes indicios de disfuncionalidad que mostraron los LiT CD8+ de los ratones IL-17RA KO durante la infección, se correspondieran con este perfil de activación alterado o estado agotado. Para evaluar esta hipótesis, se propuso analizar en los LiT CD8+ totales y específicos desarrollados en ausencia de IL-17RA, la expresión de receptores inhibitorios y de muerte. A tal fin, se evaluó por citometría de flujo la expresión de los receptores inhibitorios PD1, TIM3, 2B4 y CTLA-4 y del receptor asociado a muerte CD95/Fas en los LiT CD8+ totales y específicos para TSKB20 de ratones WT e IL-17RA infectados con *T. cruzi* al día 20 pi o controles no infectados. En comparación con los LiT CD8+ de ratones no infectados, los LiT CD8+ totales y específicos para TSKB20 de origen WT presentaron un ligero incremento en la expresión de PD1, 2B4 y TIM3 (figura 39A). En contraste, los LiT



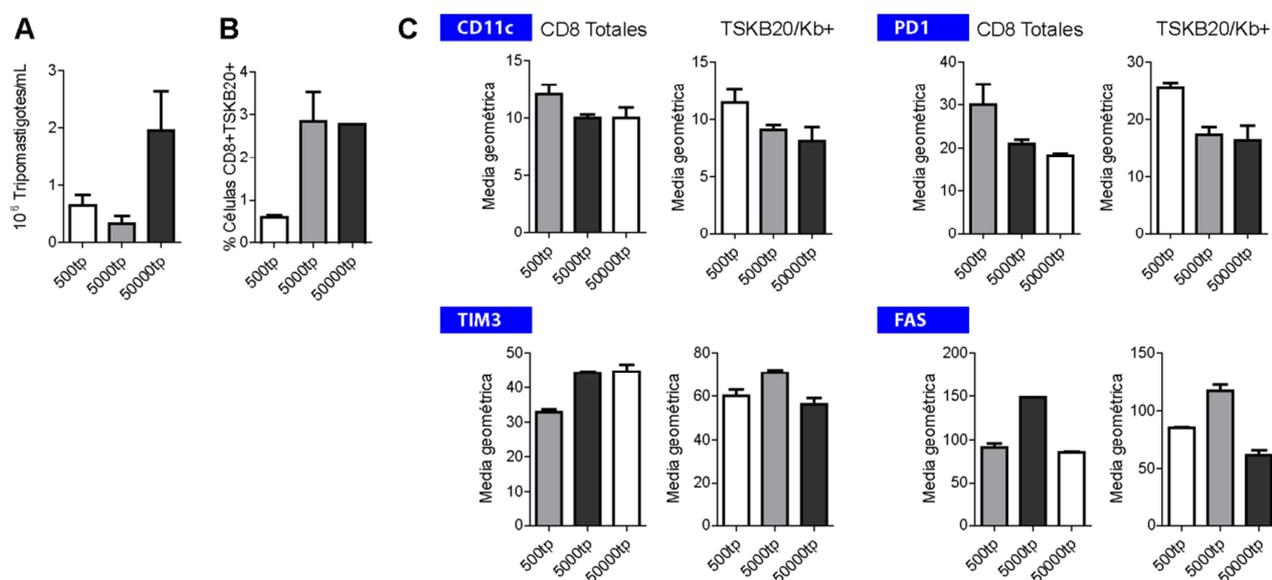
**Figura 39. Los linfocitos T CD8+ de animales IL-17RA KO infectados con *T. cruzi* muestran un perfil fenotípico compatible agotamiento celular.** Expresión de **A**) receptores inhibitorios y **B**) receptores de muerte en LiT CD8+ totales (izquierda) y TSKB20/ Kb+ (derecha) de bazo de ratones WT (izquierda) e IL-17RA KO (derecha) a los 20 días de infección con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*. Los datos en el análisis estadístico se presentan como media  $\pm$  desviación estándar,  $n \geq 4$ . Valores de p fueron calculados con test-T de dos colas. Los resultados en **A-B** son representativos de al menos cuatro experimentos independientes.

CD8+ totales y específicos de los ratones IL-17RA KO infectados mostraron mayor expresión de todos los receptores inhibitorios evaluados. Además, estas células presentaron un fenotipo propenso a apoptosis caracterizado por la expresión de altos niveles de CD95/Fas (figura 39B). Así, la señalización a través de IL-17RA durante la infección con *T. cruzi* previene el agotamiento de los LiT CD8+ del agotamiento celular.

Aunque se ha propuesto que citoquinas, en particular IL-21, regulan el proceso de agotamiento celular [121], se considera que la gran cantidad de antígeno y la persistente activación antigénica son los factores que de modo más importante condicionan al estado de agotamiento de LiT CD8+. Atendiendo a que ratones IL-17RA KO tienen mayor carga antigénica (figuras 13B, C y D), se propuso estudiar el comportamiento de los LiTCD8+ en contexto de la infección con distintas cantidades de parásito. El objetivo de este experimento fue evaluar si diferencias moderadas en la carga parasitaria repercuten significativamente en el fenotipo agotado los LiT CD8+. Ratones WT fueron infectados con distintas dosis de parásitos (500, 5.000 y 50.000 tripomastigotes) de la cepa Tulahuén, y 20 días después se

cuantificó la parasitemia y el porcentaje de LiT CD8+ totales y específicos para TSKB20, así como la expresión de marcadores inhibitorios (PD1, TIM-3), de activación (CD11c) y de muerte (FAS) .

Como puede observarse en la figura 40A, animales infectados con 50.000 tripomastigotes mostraron una parasitemia significativamente mayor a la observada en la infección convencional con 5000 tripomastigotes. Sin embargo, en relación a la dosis convencional no se observaron diferencias en la cantidad de LiT CD8+ específicos ni en la expresión de PD1 y TIM-3, CD11c, o CD95/FAS (figura 40B-C). Además, la infección con menor cantidad de parásitos tampoco incidió en el perfil de activación/agotamiento evaluado. Este experimento, si bien no reproduce necesariamente las diferencias entre la carga antigénica de ratones WT a IL-17RA KO infectados a nivel de parasitismo tisular ni contempla posibles diferencias en la cinética o calidad de respuesta derivadas de la infección con distintas dosis, permite determinar que durante esta infección la carga parasitaria no incide significativamente en el grado de agotamiento celular observado. Un experimento alternativo y más concluyente para establecer la independencia de la carga antigénica y la dependencia de la señalización intrínseca de IL-17RA en el agotamiento celular, consistiría en evaluar el perfil de agotamiento en ensayos competitivos de transferencia adoptiva idénticos a los realizados en la Figura 35F.



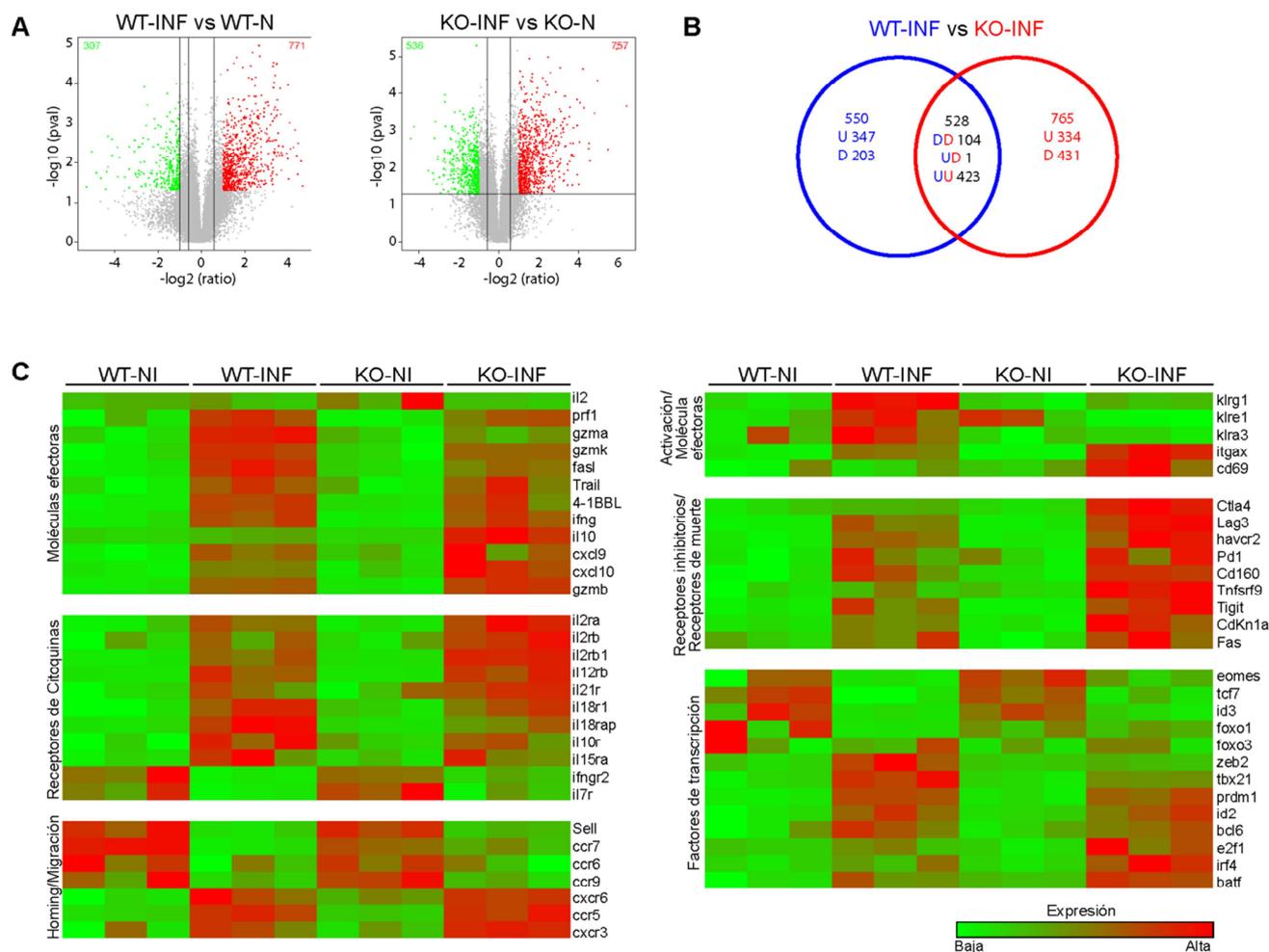
**Figura 40. La dosis de parásitos no repercute en el perfil de agotamiento celular de los LiT CD8+.** A) Parasitemia, B) porcentaje de LiT CD8+ específicos para TSKB20 y C) gráficos de barra de la media geométrica de expresión de receptores inhibitorios y de muerte en Li T CD8+ totales y TSKB20/ Kb+, de animales WT infectados con 500, 5000 y 50000 tripomastigotes de *T. cruzi* y analizados al día 20 pi.

Considerando integralmente estos resultados, puede afirmarse que durante la infección con *T. cruzi* la expresión de IL-17RA previene un agotamiento temprano de los LiT CD8+, evitando la pérdida de función y la expresión sostenida y simultánea de diversos marcadores inhibitorios.

### **La expresión de IL-17RA regula el programa transcripcional de los linfocitos T CD8 + activados durante la infección por *T. cruzi***

Posteriormente y con motivo de una caracterización más exhaustiva, se evaluó a nivel molecular el impacto global de la ausencia de la señalización de IL-17RA en el programa de desarrollo de los LiT CD8+ activadas durante la infección con *T. cruzi*. Consecuentemente, se determinaron los perfiles de expresión génica de los LiT CD8+ purificados por *cell sorting* a partir del bazo de ratones WT e IL-17RA KO no infectados o infectados con *T. cruzi* al día 20 pi. Los perfiles de expresión fueron determinados utilizando microarreglos de ADN de Affymetrix. Con objetivo de determinar el efecto de la infección la población de los LiT CD8+, se contrastó el perfil transcripcional de linfocitos de ratones infectados y no infectados dentro de la misma cepa: WT-INF *versus* WT-NI; KO-INF *versus* KO-NI. En animales WT, 1.078 genes fueron modulados (positiva o negativamente) al menos dos veces de manera estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) por la infección; mientras que en los animales IL-17RA KO 1.293 genes se vieron afectados de este modo (figura 41A-B). Posteriormente, a los fines de establecer el efecto de IL-17RA en la infección, los perfiles transcripcionales de los animales infectados se normalizaron respecto de sus controles no infectados y se compararon entre sí: WT-INF (normalizado) *versus* IL-17RA-INF (normalizado). Sorprendentemente, de todos los genes afectados por la infección, sólo 528 fueron comunes entre LiT CD8+ de ambas cepas de animales. Además, 550 genes cambiaron únicamente en los LiT CD8+ de ratones WT y 765 exclusivamente en los LiT CD8+ de ratones IL-17RA KO (figura 41B). Estos resultados reflejan que la ausencia de señalización a través de IL-17RA durante la infección con *T. cruzi* tiene un profundo impacto en el programa transcripcional de los LiT CD8+ efectores.

A fin de obtener un conocimiento más acabado de las consecuencias a nivel molecular de la deficiencia de IL-17RA en la generación de respuestas de LiT CD8+ durante la infección con *T. cruzi*, se analizó el patrón de expresión de genes agrupados de acuerdo a categorías relevantes para la biología de estas



**Figura 41. Los linfocitos T CD8+ de ratones IL-17RA KO infectados con *T. cruzi* muestran diferencias sustanciales en el perfil de expresión génica respecto a su contraparte WT.** **A)** Gráficos de volcán que muestran el número de genes que presenta una expresión que se diferencia significativamente en dos o más veces entre LiT CD8+ de ratones WT (a la izquierda) e IL-17RA KO (derecha) infectados con *T. cruzi* a los 20 días p.i. en referencia a sus homólogos no infectados. **B)** Diagrama de Venn's de los genes representados en A. Se muestra la superposición entre genes modulados por la infección en ambos grupos de ratones (WT: azul; y KO: rojo), así como aquellos modulados exclusivamente en ratones WT o IL-17RA KO; las letras D y U indican el número de sondas reguladas positiva (D) y negativamente (U). **C)** Mapas de calor de expresión de genes determinados en LiT CD8+ de ratones WT e IL-17RA no infectados o al día 22 post-infección con *T. cruzi*. Los genes se encuentran agrupados de acuerdo a categorías relevantes para la biología de los LiT CD8+.

células (figura 41 C). Los LiT CD8<sup>+</sup> de ratones IL-17RA KO infectados mostraron una disminuida expresión de muchos genes que codifican para moléculas efectoras de LiT CD8<sup>+</sup> tales como perforina-1, granzima A y K, así como Fas ligando. Por el contrario, presentaron una expresión aumentada de genes que codifican mediadores como granzima B, CXCL9, CXCL10 y notablemente, IL-10. Además, la ausencia de IL-17RA durante la infección con *T. cruzi* repercutió en los LiT CD8<sup>+</sup> en una menor expresión de genes que codifican receptores de citoquinas asociadas a la supervivencia y memoria de LiT CD8<sup>+</sup> (Il18r1, Il18rap y Il15ra); y en una mayor expresión de genes que codifican moléculas asociadas a las células efectoras de vida corta (aRIL2, IL2RB, Il12rb1 y IL12RB2). Las excepciones notables a esta regla fueron los transcritos para Il21r e IL7R (asociados a un perfil de memoria de larga vida), que fueron más abundantes en los LiT CD8<sup>+</sup> de ratones IL-17RA KO infectados que en sus homólogos WT. Los numerosos transcritos que codifican para moléculas involucradas en migración también manifestaron diferencias según la cepa de ratones. De hecho, la ausencia de IL-17RA durante la infección motivó la regulación negativa de CD62L y CCR7, y el incremento de genes cuyos productos son receptores de quemoquinas inflamatorias (CXCR6, CCR5 y CXCR3). Por su parte, los genes que codificaban para marcadores de células efectoras y de activación tales como los de la familia KLRG, CD11c y CD69 mostraron un patrón de expresión completamente diferente: mientras que LiT CD8<sup>+</sup> proveniente de ratones WT infectados mostraron altos niveles de transcritos de moléculas KLRG y bajos de CD11c (*itgax*) y CD69; los animales IL-17RA KO infectados mostraron escasa transcripción de los primeros y abundante de los segundos. También se comparó la expresión de genes cuyos productos proteicos resultan en receptores de muerte e inhibitorios asociados al agotamiento y apoptosis de LiT. Los LiT CD8<sup>+</sup> aislados de ratones IL-17RA KO presentaron, respecto de sus controles WT, mayor expresión de muchas de estas moléculas, incluyendo: Ctla4, Lag3, Havcr2, Pd1, CD160, Tnfrsf9, Tigit, Cdkn y Fas. Finalmente, se contrastó la expresión de genes que codifican a FT importantes en la diferenciación de los T CD8<sup>+</sup>. La infección afectó la expresión de muchos FT, pero el efecto que tuvo en LiT CD8<sup>+</sup> de animales IL-17RA KO no siempre fue similar al que tuvo sobre LiT CD8<sup>+</sup> de ratones WT. Al respecto se encontraron tres categorías diferentes: La primera categoría incluyó a aquellos genes que tras la infección con *T. cruzi* incrementaron su expresión de forma similar en ambas cepas. Estos incluyeron algunos genes vinculados a un destino efector (*prdm1* e *Id2*), así como al destino de memoria (*bcl6* y *foxo3*). En un segundo grupo, se incluyeron a los genes que frente la infección

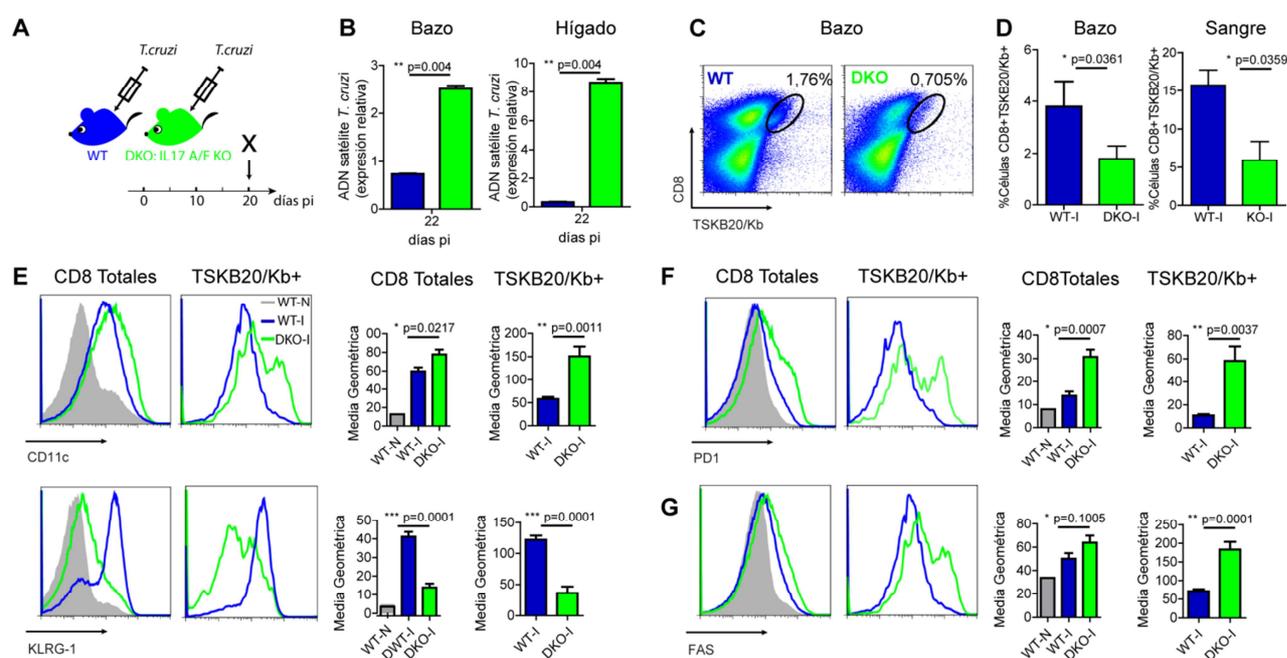
modificaron su expresión con la misma tendencia pero de forma más débil en células de animales IL-17RA KO. Estos efectos incluyeron la regulación positiva de genes asociados con células efectoras tales como *tbx21* y *zeb2* y la regulación recíproca negativa de genes asociados con células de memoria, tales como *eomes*, *tcf7*, *Id3* y *foxo1*. En la tercera categoría, se agruparon a los genes cuya expresión se indujo en el mismo sentido pero de manera más pronunciada en células IL-17RA KO respecto de sus contrapartes WT. Este grupo incluyó genes tales como *irf4* y *batf* que son críticos para la generación de LiT CD8+ efectoras [266-268], pero que también se asocian a un estado de agotamiento [269]. Por otro lado, con motivo de analizar en conjunto estos resultados para identificar si los distintos cambios descriptos se asociaban a vías biológicas determinadas, se realizaron análisis genómicos basados en la base de datos IPA (Ingenuity Pathway Analysis). Los resultados derivados del mismo señalaron que los genes que se regularon diferencialmente entre LiT CD8+ WT e IL-17RA KO, estaban asociados a las vías funcionales de "Enfermedades inmunológicas" y "Muerte celular y sobrevivencia"; y a la vía canónica de "señalización de ATM y p53".

En resumen, en la infección con *T. cruzi* el perfil de expresión génica de los LiT CD8+ de ratones WT fue compatible con el de células efectoras; mientras que el de los LiT CD8+ de ratones IL-17RA KO se diferenció del primero y presentó características mixtas: algunas compatibles con células efectoras terminalmente diferenciadas y agotadas; junto con otras asociadas a células de memoria. Estos resultados apoyaron a nivel molecular las características fenotípicas y funcionales que se describieron para los LiT CD8+ de animales IL-17RA KO infectados con *T. cruzi*.

### **IL-17A y/o IL-17F modulan la activación, previenen el agotamiento temprano e incrementan la magnitud de la respuesta de linfocitos T CD8+ específicos en la infección con *T. cruzi***

Los animales IL-17RA KO han sido ampliamente utilizados para dilucidar el papel de las citoquinas IL-17 en infecciones [159, 211]. Particularmente, la mayoría de los estudios adjudica a IL-17A y/o IL-17F muchos de los fenómenos observados [159, 167, 211]. Estas dos citoquinas presentan funciones ampliamente superpuestas y han sido implicadas en una gran variedad de fenómenos inmunológicos que van desde autoinmunidad a protección en infecciones, pasando por cáncer y alergias [144, 146, 159]. Considerando que en los ratones IL-17RA está afectada la señalización de múltiples miembros de

la familia (IL-17A, IL-17C, IL-17E e IL-17F) [147], se propuso esclarecer el papel de IL-17A/F en los fenómenos observados en LiT CD8+ durante la infección con *T. cruzi*. Para ello se utilizaron animales deficientes en las citoquinas IL-17A e IL-17F (IL-17A/IL-17F doble KO: DKO). Estos animales poseen una delección que compromete los exones de los genes *il17a* e *il17f* co-localizados en el mismo *loci* que resulta en la deficiencia conjunta de ambas citoquinas. Entonces, ratones IL-17A/IL-17F DKO y WT fueron inoculados con *T. cruzi* según el modelo convencional de infección. Luego de 20 días de infección, se evaluó: el parasitismo en bazo e hígado y la frecuencia y fenotipo de Li TCD8+ totales y TSKB20/Kb+ en bazo (figura 42A). Los hallazgos obtenidos en animales IL-17A KO, se reprodujeron completamente en los ratones IL-17A/F DKO. Respecto del parasitismo tisular, los animales que carecían de IL-17A e IL-17F mostraron mayor carga parasitaria en bazo e hígado de respecto de sus controles WT (figura 42B). En relación a la frecuencia de linfocitos específicos, ratones IL-17A/F DKO presentaron menor porcentaje de LiT CD8+TSKB20/Kb+ en bazo que sus contrapartes WT, y la

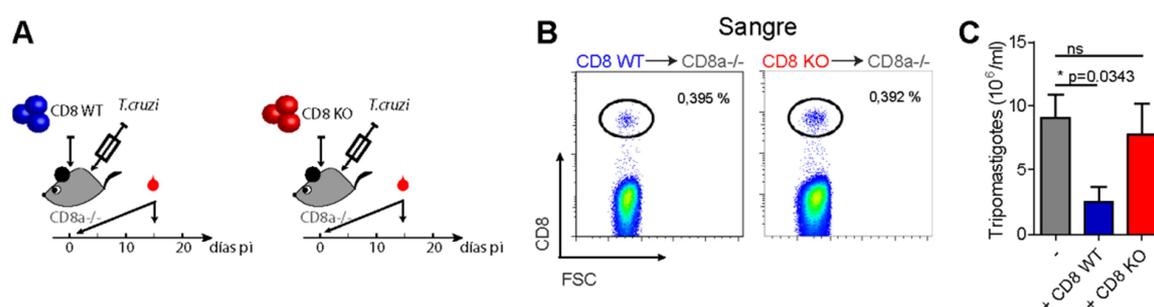


**Figura 42. La respuesta T CD8+ desarrollada ratones IL-17A/F DKO frente a *T. cruzi* recapitula el fenotipo de los animales IL-17A KO.** Estudios en ratones WT (azul) e IL-17A/F DKO (verde) al día 20 pi con *T. cruzi*. **A**) Modelo experimental. **B**) Cantidad relativa de ADN satélite de *T. cruzi* en bazo e hígado. Las cantidades de ADN fueron normalizadas a GAPDH murina. Los datos se muestran como el valor promedio de 5 ratones  $\pm$  DE. Los valores de p fueron calculados con test-T de dos colas. **C**) Porcentaje de LiT CD8+ específicos para TSKB20/Kb+ en bazo (*gate* en LiT CD8+ totales). Los gráficos son representativos de 5 animales. **D**) Análisis estadístico de la media geométrica de los receptores indicados. Los valores de p fueron calculados con test-T de dos colas. Expresión de **E**) marcadores de activación, **F**) receptores inhibitorios, y **G**) receptores de muerte en LiT CD8+ totales (izquierda) y TSKB20/ Kb+ (derecha). Los datos en el análisis estadístico se presentan como media  $\pm$  desviación estándar,  $n \geq 4$ . Valores de p fueron calculados con test-T de dos colas. Los resultados en **B-G** son representativos de al menos dos experimentos independientes.

magnitud del fenómeno fue semejante al observado con ratones IL-17RA KO (figuras 42C y D). Por último, el fenotipo de LiT CD8+ totales y específicos para TSKB20 de bazo de ratones IL-17A/F DKO se diferenció del WT por una mayor expresión de CD11c, menor expresión de KLRG-1 (figura 42E), así como una mayor expresión de PD1 (figura 42F) y CD95/FAS (figura 42G). Estos resultados junto con los observados en cultivos *in vitro* (figura 36) evidenciaron que, si bien no puede descartarse una posible participación de otras citoquinas que señalizan a través de IL-17RA como IL-17C e IL-17E, IL-17A y/o IL-17F participan activamente en el sostenimiento de LiT CD8+ específicos y en la prevención del agotamiento de la respuesta T CD8+, característica que correlacionan con menor carga de parásito en tejido.

### La expresión de IL-17RA en los linfocitos T CD8+ les confiere mayor capacidad protectora durante la infección con *T. cruzi*.

Si bien tanto en animales IL-17RA KO como en animales IL-17A/F DKO la menor frecuencia de células específicas correlacionó con mayor carga parasitaria en bazo e hígado (Figuras 13B-D, 28A-C y 42B), no se había probado que ambos fenómenos estuviesen estrictamente ligados. Con objetivo de establecer la relevancia de la señalización de IL-17RA en los LiT CD8+ durante la progresión de la infección, se realizaron experimentos de transferencia adoptiva no competitivos. A tal fin, se purificaron por selección negativa con perlas magnéticas LiT CD8+ de ratones WT e IL-17RA KO no infectados y se



**Figura 43. La expresión de IL-17RA en los linfocitos T CD8+ les confiere mayor capacidad protectora durante la infección con *T. cruzi*.** Ratones CD8a-/- transferidos con LiT CD8+ WT o IL-17RA KO e infectados con *T. cruzi*. A) Esquema experimental. B) Porcentaje de LiT CD8+ en sangre periférica de animales al día 1 pi. C) Parasitemia al día 15 pi. Los gráficos son representativos de 8 animales por grupo. Los datos se muestran como media  $\pm$  DE, n=8 ratones por grupo. Los valores de p fueron calculados con test-T. Los resultados en B-C son representativos de 2 experimentos independientes.

transfirieron a dos grupos de animales CD8a KO. Como control se utilizaron ratones CD8a KO no transferidos. Los tres grupos experimentales se infectaron de manera inmediata a la transferencia y 24 h después se analizó el porcentaje de LiT CD8+ en sangre periférica de los ratones transferidos como control de transferencia (figura 43A). Como puede observarse en la figura 43B, ambos grupos de animales trasferidos presentaron similar frecuencia de células transferidas en circulación, indicando el rendimiento estándar del procedimiento (figura 43B). Posteriormente, se evaluó la progresión a la infección de los distintos grupos a través de la cuantificación de la parasitemia y el seguimiento de la sobrevivencia. A los 15 días de infección, los ratones transferidos con LiT CD8+ que expresaban IL-17RA, mostraron menores niveles de parásitos circulantes en comparación con el grupo transferido con LiT CD8+ IL-17RA KO o con el grupo control no transferido (figura 43C). A pesar que únicamente la transferencia de LiT CD8+ capaces de responder a señales de citoquinas de la familia IL-17 logró disminuir de manera significativa la parasitemia de los ratones CD8a KO, la misma no logró revertir su extrema susceptibilidad y evitar su precipitada muerte (figura 43C y datos no mostrados). Estos resultados sugieren que las señales brindadas por citoquinas IL-17 directamente en los LiT CD8+ son importantes para la generación de células efectoras con capacidad de controlar la replicación de *T. cruzi*; aunque se requieren experimentos más concluyentes para establecer su participación en la susceptibilidad aguda a la infección. Dichos experimentos requieren el desarrollo de quimeras de médula ósea que no muestren la extrema susceptibilidad a la infección observada en los hospedadores deficientes en LiT CD8 y por lo tanto, permitan estudios a tiempos mayores de infección.

**Conclusiones:**

- Las citoquinas de la familia de IL-17 sostienen la magnitud de la respuesta de LiT CD8+ específicos en la infección con *T. cruzi*.
- La señalización intrínseca a través de IL-17RA en los propios LiT CD8+ activados brinda una ventaja para su sobrevivencia y mantenimiento durante la infección con *T. cruzi*.
- Las citoquinas de la familia IL-17 influyen la activación y diferenciación de los LiT CD8+ durante la infección con *T. cruzi*

- La señalización a través de IL-17RA durante la infección con *T. cruzi* previene el agotamiento de los LiT CD8+.
- La expresión de IL-17RA regula el programa transcripcional de los LiT CD8 + activados durante la infección por *T. cruzi*
- IL-17A y/o IL-17F sostienen la magnitud de la respuesta, influyen en el perfil de activación y previenen el agotamiento de LiT CD8+ específicos en la infección con *T. cruzi*.
- La expresión de IL-17RA en los LiT CD8+ les confiere mayor capacidad protectora en la infección con *T. cruzi*.

En conjunto, estos resultados sostienen que los LiT CD8+ requieren de la señalización intrínseca de IL-17RA para desarrollar y/o sostener una respuesta específica protectora frente a *T. cruzi*. Citoquinas de la familia IL-17 imprimen características en el programa transcripcional de LiT CD8+ que repercuten en su activación y diferenciación, al tiempo que las protege de la apoptosis y el agotamiento.

## DISCUSIÓN

Numerosos reportes resaltan que la respuesta inmune que el hospedador desarrolla para hacer frente a la infección con *T. cruzi* es sumamente compleja y resulta crítica tanto para el control del parásito como para la evolución de la patología [244]. La respuesta antiparasitaria es crucial para contener la infección, pero no logra eliminar al parásito por completo y puede incluso resultar deletérea si no se regula adecuadamente [57, 110]. Afortunadamente, luego de muchos años de co-evolución, la mayoría de las personas infectadas con *T. cruzi* logra convivir de por vida con el parásito sin manifestar la patología [270]. En este trabajo de tesis se describieron dos novedosos mecanismos a través de los cuales IL-17RA y las citoquinas que por él señalizan están involucradas en la protección del hospedador frente a la infección experimental con *T. cruzi*. Particularmente, se determinó que las citoquinas IL-17 estimulan la producción de quemoquinas que reclutan a los tejidos neutrófilos regulatorios productores de IL-10, los cuales participan en el control de la inflamación. Por otra parte, se describió que las citoquinas IL-17 actúan directamente sobre los Lin<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> previniendo su apoptosis y agotamiento, y propiciando así una respuesta citotóxica efectiva para controlar al parásito. En conjunto, los resultados aquí descritos sustentan la hipótesis de que las citoquinas de la familia IL-17 son moléculas claves en la coordinación de la respuesta inmune innata y adaptativa durante la infección con *T. cruzi*; así como en el mantenimiento del delicado balance entre inflamación y control parasitario en el que se dirime la patología de la enfermedad. A pesar de que mucho resta por conocer respecto del papel de las citoquinas IL-17 en etapas más avanzadas de infección y el correlato de los hallazgos aquí descritos en pacientes, los resultados de esta tesis contribuyen al conocimiento de la respuesta inmune en la enfermedad de Chagas, amplían las funciones de la familia de citoquinas IL-17 en infecciones, y sientan las bases para el diseño de nuevas vacunas o intervenciones terapéuticas que incluso podrían ser extensivos a otras patologías.

Trabajos publicados a lo largo de la última década adjudicaron a los miembros de la familia IL-17 roles protectores en la resistencia del hospedador frente a diferentes microorganismos [144]. En ese sentido se estableció claramente la participación de IL-17A e IL-17F en la respuesta inmune frente a infecciones bacterianas y fúngicas, se asoció a IL-17C con respuestas efectoras similares a las de IL-17A en infecciones bacterianas [162], y se demostró que IL-17E induce respuestas Th2 que contribuyen en la inmunidad del hospedador frente a helmintos [271]. La función protectora que cumple IL-17A en la resistencia a la infección con *T. cruzi* fue descrita por dos laboratorios independientes en momentos

que esta tesis comenzaba a desarrollarse [238, 239]; sin embargo, ambos reportes mostraban contradicciones importantes entre sí y no describían los mecanismos a través de los cuales IL-17 ejercía su función. Asimismo, estos estudios, aunque con diferentes modelos experimentales, exploraron el rol de IL-17A en la infección pero no los de las otras citoquinas IL-17, como IL-17F y/o IL-17C que, por poseer funciones efectoras similares, podrían haber compensado la falta de IL-17A. En este trabajo de tesis se determinó que en la infección *T. cruzi* no sólo se induce IL-17A, sino también IL-17E e IL-17F, principalmente en momentos próximos al pico de parasitemia. Se caracterizó asimismo que distintas poblaciones celulares son las encargadas de producir IL-17A, entre ellas los LiT CD4+, los LiT CD8+, los granulocitos, las células NK y células que no pertenecían a ninguna de las anteriores poblaciones (fracción negativa). La inducción de otras citoquinas de la familia IL-17 (como IL-17C, IL-17B e IL-17D) en la infección del *T. cruzi*, así como las señales que determinan la producción de las citoquinas IL-17 ya estudiadas y el tipo de células involucrada en la misma, es actualmente objeto de investigación en el laboratorio. Al respecto, reportes recientes del grupo demostraron que en la infección experimental con *T. cruzi*, los linfocitos B son la principal fuente de IL-17A [272].

Estudios preliminares determinaron que la ausencia de IL-17RA compromete la sobrevida a la infección aguda con *T. cruzi*. Estos datos se mostraron en sintonía con los aportes de Da Matta Guedes y col. y Miyazaki y col. [238, 239], así como con estudios en pacientes chagásicos que correlacionaron la respuesta de IL-17A con mejores estadios clínicos de la enfermedad [273]. El avance fundamental de este trabajo de tesis fue el esclarecimiento de algunos de los mecanismos a través de los cuales las citoquinas IL-17 ejercen esta función protectora. En este sentido, los resultados aquí presentados demuestran que durante la infección con *T. cruzi*, IL-17RA participa activamente tanto en la regulación de la inflamación y la preservación de la integridad de los tejidos como en el control del parásito en tejidos. Sin embargo, estos mecanismos protectores contribuyen en distinta medida a la susceptibilidad en la etapa aguda. Particularmente, las citoquinas IL-17 regulan la inflamación aumentando la sobrevida a la infección. En este sentido, la ausencia de IL-17RA repercutió en una respuesta inflamatoria muy pronunciada, con altos niveles de IFN- $\gamma$  y TNF que afectaron severamente al hígado y potencialmente a otros órganos vitales como el corazón y los riñones, como fue descrito para animales IL-17 KO [239]. Concluyentemente, la neutralización de IFN- $\gamma$  en ratones IL-17RA KO infectados, disminuyó los índices de mortalidad y la patología hepática hasta equipararlos con los

ratones WT controles, demostrando que la menor sobrevivencia de los animales IL-17RA KO en etapas tempranas de infección se debe a los altos niveles de IFN- $\gamma$ . Es de notar que si bien el tratamiento con anticuerpos neutralizantes de IFN- $\gamma$  logró disminuir la mortalidad de los animales IL-17RA KO, lo hizo a costa del incremento de los niveles de parasitemia. En contraste, con respecto al control de la replicación parasitaria, los ratones IL-17RA KO infectados lograron parasitemias indetectables al mismo tiempo que los animales WT y aunque mostraron mayores cantidades de ADN de *T. cruzi* en bazo, hígado y corazón a partir del día 22 pi, las mismas fueron menores a los del día pico de infección (14 pi). En conjunto, estos datos indican que, al menos en este modelo experimental, el efecto de las citoquinas IL-17 en el control de la inflamación exacerbada es más relevante para la sobrevivencia a la infección que el efecto en el control del parasitismo tisular. Sin embargo, es probable que el incremento en los niveles de parasitismo tisular en los ratones IL-17RA KO infectados que sobreviven la etapa aguda (con o sin tratamiento con IFN- $\gamma$ ) tenga importantes consecuencias para la progresión de la patología en la etapa crónica.

En contraposición al potencial pro-inflamatorio de IL-17A, descrito en autoinmunidad e infección, investigaciones recientes demostraron que también es capaz de suprimir la inflamación mediada por IFN- $\gamma$  y así prevenir el daño tisular [274]. Sorprendentemente en un modelo experimental de la enfermedad de injerto contra huésped, la deficiencia de IL-17A acentuó la severidad de la enfermedad al inducir y amplificar respuestas Th1 y altos niveles de IFN- $\gamma$  a través de su influencia sobre células dendríticas del hospedador [241]. Por otra parte, en un modelo de colitis inducido por dextrán-sulfato, IL-17A previno e IL-17F exacerbó la producción de IFN- $\gamma$  y la destrucción de tejido [165]. Asimismo IL-17E mostró tempranamente habilidades para inhibir la producción de IFN- $\gamma$  e IL-17A durante infecciones y en contextos autoinmunes [275]. Por su parte, los pocos reportes que describieron la actividad de IL-17C, la caracterizaron como pro-inflamatoria. Un punto importante a considerar al respecto es que el potencial inflamatorio descrito para IL-17C fue superado a su capacidad de inducir IL-17A, pero no así IFN- $\gamma$  [209]. En relación a los conocimientos disponibles, es posible que la producción exacerbada de IFN- $\gamma$ , el incrementado daño tisular y la mayor mortalidad que mostraron los animales IL-17RA KO infectados con *T. cruzi*, se deba a la falta de respuesta de IL-17A, IL-17F e IL-17E. Además, no se puede descartar que IL-17C también participe. Comprender la contribución

específica de cada miembro de la familia IL-17 requiere estudios más profundos que utilicen ratones deficientes para las citoquinas IL-17 individuales o combinadas.

Conjuntamente con la pronunciada respuesta inflamatoria tipo 1, la ausencia de IL-17RA durante la infección con *T. cruzi* resultó en la reducción del número de neutrófilos en distintos órganos como bazo e hígado. Congruentemente, se registró una disminuida producción de quemoquinas involucradas en el reclutamiento de neutrófilos, como son CXCL1 y CXCL2. Si bien era posible que otras quemoquinas no afectadas por las citoquinas IL-17 compensaran el defecto de CXCL1, CXCL2 en los animales IL-17RA KO infectados [276], éstos mostraron una marcada disminución de neutrófilos en periferia y una menor eficiencia en el reclutamiento neutrófilos transferidos. De acuerdo con investigaciones previas que describieron que bajo distintas condiciones inflamatorias la ausencia conjunta de CXCL1 y CXCL2 resulta en un notable compromiso de la migración de neutrófilos [276], estos resultados sugieren que la ausencia de IL-17RA en los animales infectados con *T. cruzi* resulta en una disminuida capacidad de reclutar neutrófilos a los tejidos.

A pesar que los neutrófilos fueron históricamente consideradas como estrictos componentes de la respuesta inmune innata; gran cantidad de reportes sugiere que expresan abundante variedad de PRRs y responden a señales del microambiente produciendo citoquinas y quemoquinas que modulan la respuesta inmune innata y adaptativa [179]. De hecho, la comunicación y coordinación de respuestas entre neutrófilos y LiT ha sido descrita en muchas situaciones fisiológicas y patológicas, incluidas la inflamación aguda y crónica que acontece tanto en la respuesta inmune frente a microorganismos, como así también en cáncer [277]. Considerando reportes previos que describían el potencial regulatorio de los neutrófilos [250, 276, 278] y los resultados que demostraban que los animales infectados en ausencia de IL-17RA presentan mayor inflamación y menor infiltrado de neutrófilos en los tejidos periféricos que sus controles WT, la investigación se focalizó en explorar una posible relación entre neutrófilos y la regulación de la inflamación. Respecto del rol de los neutrófilos en la infección con *T. cruzi*, se sabía que resultaban protectores o deletéreos según la cepa de ratón [279]. Sin embargo estos estudios se realizaron con anticuerpos específicos para Gr-1, que reconocen las moléculas de superficie Ly-6G (específica de neutrófilos) y Ly-6C que se expresa en neutrófilos pero también en células dendríticas, monocitos, macrófagos y linfocitos. De esta manera los efectos reportados no podían ser asociados exclusivamente de la ausencia de neutrófilos en la infección, sino

de todos los tipos celulares que expresan Gr-1 [279]. En este sentido, el papel de los neutrófilos en la infección con *T. cruzi* requería de nuevos estudios que exploraran su función *in vivo*, ya sea reforzando su número con transferencias adoptivas o disminuyéndolo con anticuerpos anti-Ly6G, específicos para células del linaje polimorfonuclear. En este trabajo, las repetidas transferencias adoptivas de neutrófilos que se realizaron durante la infección con *T. cruzi* se tradujeron en una menor parasitemia en ambas cepas de ratones infectados, y en una reducción de la producción de IFN- $\gamma$  solo en el caso de la cepa WT. Estos hallazgos indicaron que, de manera semejante a lo que ocurre con *Plasmodium falciparum* en su etapa sanguínea [280], los neutrófilos están directamente involucrados en la destrucción o fagocitosis de las formas circulantes de *T. cruzi*. Interesantemente, un reporte reciente ensaya la capacidad de los neutrófilos de modular *in vitro* la actividad microbicida de macrófagos, concluyendo que según la cepa de animales (BALB/c o C57BL/6), los neutrófilos aumentan o reducen respectivamente, la carga parasitaria de los co-cultivos [281]. Asimismo, en los experimentos de esta tesis, los neutrófilos transferidos redujeron la parasitemia a través de un mecanismo independiente de su migración a tejido y de su expresión de IL-17RA. En contraste, la actividad regulatoria de los neutrófilos transferidos sobre la respuesta adaptativa (y su consecuente reducción de la concentración sistémica de IFN- $\gamma$ ) dependería, en este caso, de la migración mediada por citoquinas IL-17 a sitios efectores. Es interesante resaltar que la disminución de la parasitemia que mostraron los animales IL-17RA KO luego de la transferencia de neutrófilos, no fue suficiente para disminuir la alta mortalidad de los ratones IL-17RA KO infectados, sugiriendo que (al menos en este modelo) una inflamación exacerbada reduce la resistencia durante la etapa aguda aún en presencia de un mejor control del microorganismo. En el mismo sentido, ratones WT e IL-17RA KO infectados que fueron tratados con anticuerpos anti-Ly-6G que depletan específicamente a células del linaje de neutrófilos, aumentaron notablemente sus concentraciones de IFN- $\gamma$  y TNF. Concomitante, en ambas cepas el tratamiento produjo la disminución de los niveles IL-10, hecho que podría explicar la incrementada inflamación antes descrita. Por su parte, los ratones WT tratados presentaron una respuesta inflamatoria tipo 1 más acentuada y mayores niveles de transaminasas hepáticas en plasma, pero también menor parasitemia e inalterada supervivencia a la infección respecto de los no tratados. Es interesante discutir al respecto que, aunque los ratones WT tratados con anti-Ly-6G mostraron frente a la infección un comportamiento similar en ciertos aspectos a los animales IL-17RA KO (notable inflamación y daño

tisular), mantuvieron mayores índices de sobrevivencia. Hay muchas explicaciones posibles para estos resultados, y las mismas pueden operar tanto en forma individual como simultánea. Una alternativa es que la ausencia de IL-17RA en la infección afecte mecanismos regulatorios paralelos al reclutamiento de neutrófilos productores de IL-10. En relación a ello, se proyecta evaluar la posible contribución de la IL-17E en la migración de eosinófilos a tejido periférico y ensayar la capacidad de estas células para limitar respuestas inflamatorias. Por otra parte, el efecto intrínseco de citoquinas IL-17 sobre las células Th1 no ha sido descartado. Como sugieren los estudios realizados en un modelo de colitis [165], IL-17A podría regular negativamente la expresión de T-bet y la diferenciación hacia un perfil Th1 durante la infección con *T. cruzi*. De este modo la ausencia de señalización a través de IL-17RA desencadenaría la pérdida de este mecanismo regulatorio de forma independiente de otras señales extrínsecas. Además, en base a reportes previos y nuestros hallazgos que establecen que IL-17A es necesaria para el desarrollo de respuestas citotóxicas y humorales [186, 282], es posible que los animales WT tratados con anti-Ly6G presenten menos neutrófilos regulatorios pero a la vez presenten mayor cantidad y mejor funcionalidad de Lin<sup>+</sup> CD8 específicos que los animales IL-17RA KO. Finalmente, otra posible explicación es que los pocos neutrófilos que permanecen en tejido de los animales WT infectados tras el tratamiento con anticuerpo anti-Ly6G sean capaces de contener parcialmente la intensa inflamación y prevenir los eventuales daños de tejido. Por su parte, el tratamiento de depleción aplicado a ratones IL-17RA KO que *per se* presentaban baja cantidad de neutrófilos tisulares en la infección, pronunció aún más la exacerbada producción de IFN- $\gamma$  y TNF y acrecentó el daño hepático. En estos animales se desató consecuentemente una enfermedad terminal que cursó con altas parasitemias y elevados índices de mortalidad. En conjunto, estos resultados demostraron que durante una infección de *T. cruzi*, además de su función innata en el control parasitario, los neutrófilos modulan la respuesta inflamatoria adaptativa.

Se ha reportado que las células T regulatorias (FOXP3<sup>+</sup>) cumplen un rol limitado durante la infección con *T. cruzi* [117, 283]. En este contexto podrían jugar un papel protagónico otras poblaciones celulares con capacidad regulatoria, como por ejemplo: los neutrófilos, las células B reguladoras y los macrófagos M2. El rol supresor de los neutrófilos ha sido enfatizado recientemente, en estrecha relación a la descripción de las células mieloides supresoras [284]. Al mismo tiempo, dos reportes describieron la existencia de neutrófilos regulatorios productores de IL-10 durante una infección

bacteriana y melanoma [250, 251]. Otro trabajo describió también, utilizando ratones que poseen  $\beta$ -lactamasa bajo el promotor de IL-10, que los neutrófilos eran la principal fuente de IL-10 durante una infección sistémica con *Yersinia enterocolitica* [285]. Asimismo, estudios recientes en la infección experimental con *T. cruzi* evidenciaron que los animales de la cepa BALB/c tienen mayor sobrevida que los de la cepa C57BL/6, al menos en parte, porque presentan mayor cantidad de células con fenotipo Ly6G<sup>+</sup> caracterizadas allí como células mieloides supresoras [286]. En este sentido los resultados de esta tesis demostraron que los neutrófilos de médula ósea de ratones no infectados al ser estimulados con tripomastigotes, producen IL-10 como así también TNF pero no otras citoquinas pro-inflamatorias. Aún más, los neutrófilos de bazo purificados de animales infectados mostraron también alta producción de IL-10 y baja de TNF, luego de una re-estimulación con el parásito. Estos datos sugirieron que la infección con *T. cruzi* de alguna manera imprime en estas células un estado regulatorio. Sorprendentemente, los neutrófilos purificados de bazo de ratones infectados con *T. cruzi* exhibieron función supresora: inhibieron la proliferación de células T y producción de IFN- $\gamma$  en un modo dependiente de IL-10R. Además, experimentos de transferencia adoptiva donde se comparó la actividad regulatoria de neutrófilos IL-10 KO con sus controles WT corroboraron *in vivo* que su potencial supresor se subordina a su capacidad de producir IL-10: en su ausencia los neutrófilos no fueron capaces de limitar la inflamación ni extender la sobrevida, aunque si disminuyeron la parasitemia. Es de resaltar que los neutrófilos deficientes de IL-17RA produjeron similares cantidades de IL-10 y mostraron *in vitro* la misma habilidad supresora que sus contrapartes WT, sugiriendo que las señales de IL-17RA en los mismos neutrófilos no son requeridas para la adquisición del fenotipo regulador o migración dentro del tejido. Tanto ligandos de TLR [250] como la proteína del amiloide sérico A (SAA, reactante de la fase aguda) [251], han demostrado promover la diferenciación de los neutrófilos hacia un perfil productor de IL-10. Mientras que *T. cruzi* expone varios ligandos de TLR-2 y TLR-4 [76], también estimula la producción de SAA en los macrófagos [287]. Asimismo, resultados de esta tesis indicaron que los LiT CD8<sup>+</sup> de animales infectados presentan elevado el transcripto para esta proteína y que la ausencia de IL-17RA lo incrementa notablemente (datos no mostrados). De esta forma, es probable que durante la infección parasitaria ambas señales cooperen en generar un ambiente inductor de neutrófilos supresores, productores de IL-10. En resumen, los resultados hasta aquí expuestos demostraron que la IL-17RA regula la producción de IFN- $\gamma$  y daño en el tejido que se

sigue a la infección con *T. cruzi*, al menos en parte, mediante el reclutamiento de neutrófilos supresores, productores de IL-10.

Aunque hace ya varios años que se demostró el requerimiento de IL-10 para prevenir los daños inflamatorios y la mortalidad durante la infección con *T. cruzi* [113, 114], los resultados de este trabajo de tesis proveen información novedosa y relevante respecto de una de las fuentes de IL-10 y la función regulatoria de los neutrófilos, expandiendo la comprensión del complejo mecanismo que regula la inflamación durante esta infección parasitaria. Además, en este trabajo se describe por primera vez la relación entre la función protectora de citoquinas IL-17 en infecciones, y el reclutamiento de neutrófilos productores de IL-10 que regulan las respuestas inflamatorias Th1. Se ha reportado que los LiT productores de IL-17 cumplen una función protectora en la resistencia a infecciones bacterianas [184], al tiempo que se ha descrito en las mismas que mecanismos supresores mediados por neutrófilos productores de IL-10 mitigan las respuestas patológicas inflamatorias pero también perjudican la erradicación de la bacteria [250]. Estos fenómenos aparentemente independientes podrían estar emparentados a través de un mecanismo similar al descrito en este trabajo de tesis. Considerando estos antecedentes y los resultados aquí expuestos, es posible que el mecanismo regulatorio mediado por citoquinas IL-17 que involucra el reclutamiento de neutrófilos supresores productores de IL-10 pudiera ser extrapolable a otras infecciones. Es importante destacar también que durante muchos años el estudio de neutrófilos regulatorios estuvo limitado por la imposibilidad de detectar la producción de IL-10 por parte de neutrófilos humanos [288, 289]. Sin embargo, investigaciones recientes demostraron que bajo ciertos contextos los neutrófilos humanos producen IL-10 [290, 291], y por tanto los resultados de esta tesis podrían tener su correlato en pacientes chagásicos.

El logro del correcto balance entre el control del parásito y el daño tisular es crucial para sobrevivir a la infección con *T. cruzi* y para prevenir el desarrollo de sintomatología. A este nivel es de fundamental importancia tener en cuenta que, si bien diferencias leves en las cantidades de parásito pueden no condicionar la sobrevida temprana a la infección, es altamente probable que condicionen la patología crónica característica de la enfermedad, como se describió tanto en modelos experimentales como en pacientes [37, 53, 54, 270, 292, 293]. Numerosos estudios resaltan que, del mismo modo que las citoquinas anti-inflamatorias correlacionan con mejores estadios de la enfermedad, menores

cantidades de parásitos también repercuten marcadamente en menores patologías. En este sentido, la mayor carga parasitaria que presentan los animales IL-17RA KO a partir del día 22 pi y hasta el período crónico de la infección (día 130 pi) respecto de sus controles WT, podría repercutir en mayor patología. Así, el estudio de IL-17RA en durante la infección parasitaria podría aportar a profundizar las bases moleculares de la patogénesis de la enfermedad de Chagas. Numerosos mecanismos podrían intervenir a este nivel: por ejemplo, reportes de Freitas y col. [294] describieron que las señales a través de IL-17RA en el propio neutrófilo estimulan su capacidad microbicida a través de un mecanismo dependiente de óxido nítrico. Por otro lado, también se describió que las señales a través de IL-17RA sostienen la respuesta y funcionalidad de macrófagos y células NK [168, 294]. A pesar de que estos y otros mecanismos podrían estar operando en los experimentos aquí descriptos, llamó particularmente la atención que la diferencia de parasitismo tisular entre animales WT e IL-17RA KO ocurriera recién a partir de tiempos relativamente avanzados de infección. En relación a ello, este trabajo se concentró en el estudio de la inmunidad adaptativa, particularmente de LiT CD8+, y develó un mecanismo inédito a través del cual IL-17RA y las citoquinas de la familia IL-17 que señalizan por este receptor, participan en el desarrollo, diferenciación y mantenimiento de esta población. La respuesta citotóxica mediada por LiT CD8+ es crítica para el control de la infección con *T. cruzi*, aunque no logra eliminar completamente al parásito permitiendo el establecimiento de una infección crónica [9]. Trabajos recientes evidencian que durante esta infección es posible manipular la respuesta de linfocitos T citotóxicos a favor del hospedador utilizando estrategias de inmunización con ADN o adenovirus que codifican antígenos del microorganismo [130]. Así, la investigación de los mecanismos subyacentes al desarrollo de potentes respuestas citotóxicas es de vital importancia para identificar nuevos blancos que permitan mejorar las estrategias de vacunación o tratamiento durante la infección con *T. cruzi*. Eventualmente, estos hallazgos podrían ser aplicados en condiciones que requieran respuestas robustas de LiT CD8+, como otras infecciones por microorganismos intracelulares (virus, bacterias o parásitos) o incluso cáncer.

Durante las últimas décadas, numerosos reportes han ido forjando el concepto de que las citoquinas ejercen una influencia clave en la diferenciación, eficacia y permanencia de respuestas de LiT CD8+ [121]. Resultados de este trabajo de tesis aportan nuevos elementos para la comprensión de la exquisita modulación de este proceso. Una primera aproximación al estudio de Li T CD8+ en la

infección con *T. cruzi* constató el desarrollo de una respuesta robusta, tal y como había sido publicado anteriormente [126]. Al focalizar el análisis en la cinética de la misma, se corroboró que se manifiesta tardíamente en comparación con las descritas en modelos de infección experimental con *Listeria* y LCMV [295, 296], aunque se definen de manera concisa las distintas fases características de la respuesta citotóxica: expansión (desde los 10 hasta los 30 días post- infección) y contracción (del día 30 al 60 de infección). Al evaluar la cinética de LiT CD8+ específicos en ratones que carecían del receptor A de IL-17 se encontró que si bien la expansión inicial era semejante a la de los ratones WT, tempranamente gran cantidad de células moría por apoptosis produciendo una abrupta contracción de la respuesta. De manera consecuente, el grupo de ratones IL-17RA KO infectados exhibió *in vivo* una reducida respuesta citotóxica específica.

Además, se demostró que estos fenómenos eran independientes de la cepa de parásito y de la especificidad evaluada. Experimentos de transferencia adoptiva fueron concluyentes en demostrar que la ausencia del receptor en el LiT CD8+, compromete fuertemente su permanencia. Más aún, experimentos de protección demostraron que LiT CD8+ que carecen de IL-17RA son menos eficientes en controlar la replicación parasitaria que los que presentan IL-17RA. Se desprende de estos resultados que para obtener una respuesta T CD8+ robusta frente al parásito, es crucial la señalización intrínseca de IL-17RA. Sin embargo, estos hallazgos no excluyen la posibilidad que mecanismos extrínsecos adicionales que involucren a IL-17RA, se presenten de manera simultánea y contribuyan a la adquisición de algunas de las características cualitativas de los LiT CD8+ específicos.

Los resultados de este trabajo de tesis son los primeros en respaldar la influencia directa de citoquinas IL-17 sobre la inmunidad adaptativa, específicamente en el mantenimiento de LiT CD8+ durante la infección con *T. cruzi*. Hasta ahora, el rol protector de IL-17A en la resistencia a infecciones con bacterias, hongos, virus y parásitos ha sido dependiente de la activación de células no-inmunes o células de la inmunidad innata [144, 229]. Si bien existen publicaciones que describen la influencia de estas citoquinas sobre la respuesta inmune adaptativa, los mecanismos involucrados han sido indirectos [169, 216]. En este sentido también, modelos de melanoma e infección con *Listeria* fueron útiles para evidenciar el rol protector de citoquinas IL-17 en la promoción de respuestas T CD8+ específicas [186, 187], a través del reclutamiento de células dendríticas que realizan presentación cruzada de antígeno. Si bien el hecho de que los LiT CD8+ expresen IL-17RA los vuelve blancos

potenciales de un efecto directo de citoquinas IL-17 [297], algunos trabajos mostraron la ausencia de efectos (apoptosis e inducción de genes blancos) mediados por IL-17A recombinante en cultivos *in vitro* de LiT CD8+ [187, 298]. Estos resultados deberán reconsiderarse a la luz de la dificultad de simular *in vitro* la complejidad de la respuesta *in vivo* que acontece en un proceso infeccioso, donde varias señales externas modulan la sensibilidad a las citoquinas IL-17. En este sentido, se ha demostrado que citoquinas que influyen poderosamente la expansión y diferenciación de LiT CD8+, como IL-15 e IL-21, aumentan significativamente la expresión de IL-17RA [297, 298]. De hecho, se ha establecido que se requieren altos niveles de IL-17RA para lograr respuestas eficaces de IL-17 [299, 300]. Es posible entonces que la inducción de IL-17RA en células T CD8+ y su consecuente capacidad de respuesta a citoquinas IL-17, requiera un contexto de activación adecuado (como un proceso infeccioso). Otro factor a considerar es que, de acuerdo a los resultados de esta tesis, la expresión de IL-17RA no es homogénea entre las distintas subpoblaciones de LiT CD8+, y las células *naive* son las que presentan menor expresión de IL-17RA. En este sentido, se resalta que los experimentos aquí descritos, que evidenciaron el efecto directo de las citoquinas IL-17 en los LiT CD8+, correlacionaron con alta expresión de IL-17RA. Cuestionamientos respecto a la contribución diferencial de distintos miembros de la familia IL-17 al efecto observado, es actualmente un tópico de interés en nuestro laboratorio. En relación a ello, los experimentos en ratones IL-17A/F DKO indican la contribución de IL-17A y/o F en la magnitud y calidad de la respuesta citotóxica descrita en animales IL-17RA KO. Es probable entonces que IL-17A y/o F sean los responsables directos de los efectos intrínsecos de IL-17RA en los LiT CD8+. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que las otras citoquinas de la familia IL-17 tengan efectos similares. En este sentido IL-17C, que muestra en distintos contextos un comportamiento similar a IL-17A e IL-17F [146, 169, 197, 301], podría tener efectos semejantes. Resta profundizar los estudios respecto de los papeles individuales de IL-17A e IL-17F, y explorar la participación de IL-17C y los demás miembros de la familia IL-17 en la resistencia a la infección con *T. cruzi*.

Una vez determinado el efecto de las citoquinas IL-17 en la respuesta T CD8+, el trabajo se focalizó en establecer los mecanismos involucrados. En tal sentido, se determinó que la ausencia de IL-17RA durante la infección con *T. cruzi* desencadena una respuesta de LiT CD8+ cuyo fenotipo es compatible con un destino de memoria (es decir, KLRG-1<sup>bajo</sup>CD127<sup>alto</sup>CD122<sup>alto</sup>) y cuyo nivel de activación es pronunciado (CD69<sup>alto</sup>CD25<sup>alto</sup>CD11c<sup>alto</sup>). Además, se estableció que la señal a través de IL-17RA en los

LiT CD8+ es crucial para una adecuada respuesta efectora caracterizada por la capacidad de degranular y de producir citoquinas. La ausencia de esta señal correlacionó con menor capacidad efectora y alta expresión de receptores inhibitorios y del receptor de muerte Fas. Tales características se asemejan a las descritas en bibliografía para LiT CD8+ agotados. El agotamiento se ha asociado en infecciones virales crónicas, a pérdida progresiva de la función, sostenida expresión de receptores inhibidores, y alta susceptibilidad a la apoptosis [132, 265]. Dado que el fenotipo agotado se encuentra con más frecuencia en infecciones virales con altos títulos del patógeno, se ha postulado que los factores más importantes en el agotamiento son justamente las altas cargas antigénicas y su persistencia [265]. Por otro lado, es relevante para este trabajo considerar que los LiT CD8+ con fenotipo agotado se han reportado en modelos de infección parasitarias crónicas con *Toxoplasma*, *Plasmodium* sp. y *Leishmania* sp. Sin embargo, modelos experimentales de infección con citomegalovirus murino y *T. cruzi* han demostrado que no todas las infecciones crónicas tienen como resultado el agotamiento de las células T [302]. La consideración conjunta de tales antecedentes sugiere que la alta y persistente carga antigénica no es el único factor que determina del agotamiento de LiT CD8+ durante infecciones. De hecho se ha visto que citoquinas, particularmente la IL-21 derivada de la colaboración con células T CD4+, juegan un papel esencial en la regulación del agotamiento de los LiT CD8+ [121]. Curiosamente, se encontró que la respuesta de LiT CD8+ no agotada y completamente funcional que presentaban los ratones WT infectados con *T. cruzi* (resultados de esta tesis y Bustamante y col. [129]), sufrió un radical cambio en ausencia de señal a través IL-17RA, convirtiéndose en una respuesta citotóxica agotada y poco funcional. Estos resultados indican que la señalización a través de IL-17RA es necesaria para prevenir el agotamiento durante una respuesta de LiT CD8+ "normal" frente a la infección con *T. cruzi*. Asimismo, estos hallazgos sugieren que la ausencia de IL-17RA conduce a un agotamiento muy temprano de los LiT CD8+, por mecanismos que aún no se han dilucidado. Si bien la mayor carga parasitaria observada en tejidos de ratones IL-17RA KO podría ser responsable del agotamiento de las células T CD8+, los LiT CD8+ de ratones WT infectados con mayor número de parásitos no mostraron ni menor capacidad citotóxica, ni marcado aumento de receptores inhibitorios, incluso en las fases crónicas [303]. Tales resultados descartarían parcialmente a la carga antigénica elevada como factor que dictamina el perfil agotado de los LiT CD8+ durante la infección con *T. cruzi*. La posibilidad que surge consecuentemente, es que la acción directa de citoquinas IL-17 sobre los LiT CD8+ previene un

perfil agotado a través de algún mecanismo desconocido. En apoyo a esta hipótesis, se ha reportado que los LiT CD8+ agotados que se derivan de la infección con LCMV presentan menor expresión de IL-17RA [304]. Por otra parte, se ha reportado que IL-21, una citoquina crítica para evitar el agotamiento de las células T CD8+, no sólo induce la expresión de IL-17RA en las células T CD8+ como se mencionó anteriormente [297, 298], sino que también inicia y amplifica la diferenciación del perfil Th17 [305]. El estudio de los posibles efectos sinérgicos o aditivos de IL-17RA e IL-21R en la regulación del agotamiento de las células T CD8+, merece una exploración más profunda. La comprensión integral de este proceso es crítica para el diseño de mejores estrategias encaminadas a revertir o evitar el estado de agotamiento y potenciar la respuesta inmune durante infecciones persistentes.

El estudio de los LiT CD8+ en modelos de infecciones virales y bacterianas, proveyó información sumamente relevante respecto al transcriptoma característico de cada uno de los estadios de diferenciación descriptos para estas células: *naive*, efector, memoria y agotado [135, 306, 307]. Los expertos en el tema consideran que, en última instancia, una red de FTs es la que dictamina los programas de desarrollo que van a generar una huella o perfil transcripcional para cada subpoblación de LiT CD8+. Es oportuno destacar que esta huella es capaz de conferir a cada población un fenotipo, distribución tisular, homeostasis y función efectora específica [122]. Al analizar el transcriptoma de los LiT CD8+ provenientes de animales WT infectados con *T. cruzi*, se encontró que estas células poseen un patrón de transcripción (es decir, la expresión de genes que codifican moléculas efectoras, receptores de citoquinas y quemoquinas, moléculas de migración y FTs) similar al descripto para LiT CD8+ efectores presentes en infecciones virales y bacterianas [306, 308]. Este hallazgo proporciona un soporte adicional a la concepción de que la regulación del perfil transcripcional de LiT CD8+ efectores (y probablemente también de memoria), es esencialmente el mismo independientemente del microorganismo que lo induce (virus, bacteria, parásito). Es importante destacar que el análisis del perfil transcripcional de los LiT CD8+ de animales WT infectados con *T. cruzi*, arrojó una completa compatibilidad con el fenotipo y funcionalidad efectora observados para LiT CD8+ totales y específicos para el parásito. Por otro parte, la ausencia de señalización mediada por IL-17RA de manera directa y/o indirecta sobre los LiT CD8, modificó drásticamente su programa de desarrollo. Esto se evidencia a nivel de expresión génica donde se constató que genes fuertemente modulados por la infección con *T. cruzi*, fueron diferentes entre LiT CD8+ aislados de ratones WT e 17RA KO infectados. Los LiT CD8+

provenientes de ratones IL-17RA KO infectados se distinguieron nuevamente de sus contrapartes WT, al mostrar un transcriptoma compatible con las características fenotípicas y funcionales que se describió en un comienzo.

En este contexto, resulta de particular interés el análisis pormenorizado del perfil transcripcional de LiT CD8+ aislados de ratones IL-17RA KO en términos de los FTs capaces de guiar los programas de desarrollo implicados en la diferenciación de estas células [122]. En tal sentido, los LiT CD8+ aislados de ratones IL-17RA KO infectados presentaron en comparación con sus contrapartes WT menor expresión de los genes *Tbx21* y *Zeb2*, y mayor expresión de *Eomes*, *Tcf7*, *Id3* y *Foxo1*, características fenotípicas de memoria. Contrariamente a lo esperado en función al perfil de marcadores inhibitorios que mostraron los LiT CD8+ IL-17RA KO, éstos no evidenciaron una incrementada expresión del gen codifica para Blimp-1, un factor de transcripción asociado al agotamiento [122]. De hecho, estas células mostraron altos niveles de transcriptos que codifican IRF-4 y BATF, dos FTs individualmente asociados a programas de desarrollo que llevan a la diferenciación de LiT CD8+ hacia un perfil efector temprano [267, 268, 309-311]. Curiosamente, se ha reportado que la expresión aumentada de BATF es inducida por ligandos de PD-1 y se asocia con el agotamiento de LiT CD8+ durante infecciones virales crónicas en humanos y ratones [269]. Por su parte, IRF-4 no ha sido asociado directamente a agotamiento, pero sí a la inducción de varios genes blancos del mismo, como son: Blimp-1, CTLA-4 e IL-10 [124, 312, 313]. Atendiendo a que la expresión de IRF-4 depende directamente de la activación de TCR, es probable que el agotamiento celular mediado por la alta estimulación antigénica se acompañe de alta expresión de IRF-4. Por otro lado, se conoce que BATF e IRF4 cooperan activamente en muchas poblaciones celulares [313-315], incluyendo a LiT CD8+ [266, 267]. De tal manera es concebible que la expresión sostenida de altos niveles de ambos FTs podría resultar en el agotamiento de las células, tal y como sucede en LiT CD8+ de ratones IL-17RA KO infectados. Dilucidar la vinculación de la tríada que resulta de la pérdida de señalización de IL-17RA, el aumento en expresión de BATF e IRF-4 y el agotamiento de células T CD8+, requiere de estudios moleculares adicionales que surgen como proyección de esta tesis.

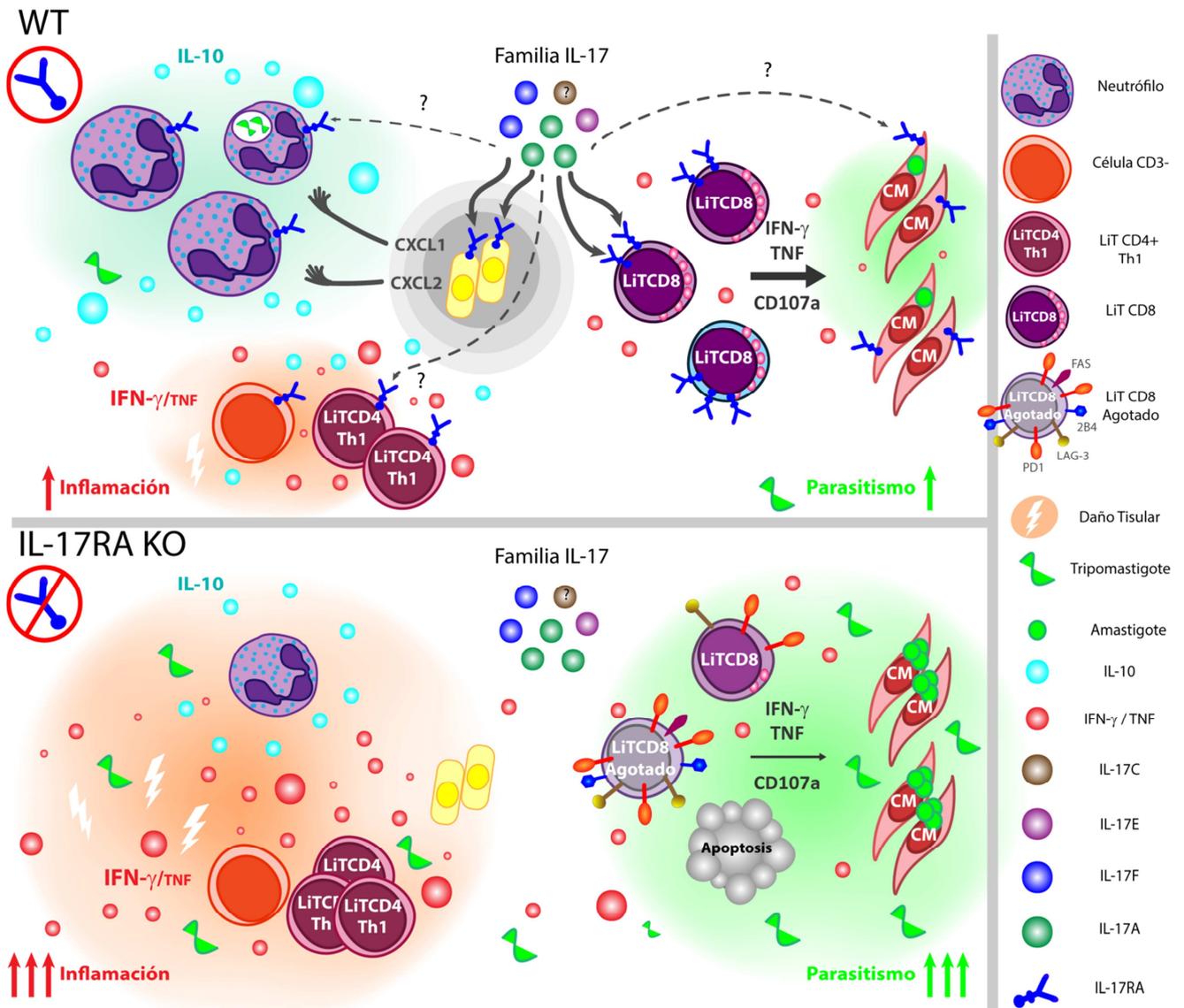
Por otra parte, si bien los modelos experimentales son particularmente útiles para estudiar muchos de los fenómenos que acontecen en distintas patologías, es necesario retomar estudios en pacientes. En este sentido, investigaciones con pacientes adultos infectados con *T. cruzi* describieron que estadios

más avanzados de la patología chagásica se correlacionan con mayor frecuencia de LiT CD8+ que expresan CD45RA-CD28-CD27- (asociado a senescencia) [316], así como diversos marcadores inhibitorios [131], ambos fenotipos asociados a disfuncionalidad. Además, se ha reportado que la gravedad de la patología muestra una relación inversa con la producción de IL-17 [273]. Pese a que todos estos hallazgos han sido reportados de forma independiente, los resultados de esta tesis sugieren que podría haber una relación causal entre los bajos niveles de IL-17, la disfunción de LiT CD8+ y la progresión de la infección.

El conocimiento que se desprende de los resultados de esta tesis podrían configurar un marco de referencia para el entendimiento del desarrollo de la respuesta citotóxica adaptativa en diversos contextos donde la respuesta mediada por IL-17 juega un rol preponderante como infecciones con otros microorganismos, cáncer y autoinmunidad. Sin embargo es necesario determinar fehacientemente si las citoquinas IL-17 potencian la respuesta T CD8+ en otras infecciones donde intervienen en la resistencia del hospedador. Por otra parte, estos resultados en conjunción con los de una publicación reciente que sostiene que IL-17 controla la competencia funcional de células NK frente a una infección fúngica [168], sugieren que las citoquinas de la familia IL-17 podrían ser importantes para la respuesta citotóxica tanto innata como adaptativa. En consecuencia, estos resultados tienen dos repercusiones fundamentales en el campo de las respuestas inmunes mediadas por IL-17. La primera es la noción de que la promoción de la producción de citoquinas IL-17 durante infección o vacunación puede ayudar a generar respuestas citotóxicas más efectivas para resistencia a distintos microorganismos y eventualmente tumores. La segunda es que tratamientos prolongados dirigidos a atenuar IL-17 podrían provocar efectos no deseados que comprometan una respuesta citotóxica protectora en infecciones o cáncer. En contraste, este efecto adicional de la neutralización de IL-17 sobre la respuesta citotóxica podría doblemente ser beneficioso en condiciones de autoinmunidad o inflamación exacerbada, al limitar el potencial inflamatorio de la citoquina y simultáneamente inducir el agotamiento de LiT CD8+.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis indican que las citoquinas de la familia de IL-17 que señalizan por IL-17RA juegan un papel protector clave durante la infección intracelular con el parásito *T. cruzi*. La investigación de los mecanismos protectores involucrados indica que los efectos protectores de las citoquinas IL-17 dependen tanto de la modulación de la respuesta inmune innata

como de la adaptativa. En este sentido, las citoquinas IL-17 favorecen el reclutamiento de neutrófilos que, en el contexto de la infección con *T. cruzi*, adoptan un perfil regulatorio dependiente de la producción de IL-10 y colaboran así con la regulación de la inflamación; y por otro actúan de forma directa sobre los Lin CD8+ regulando su supervivencia, activación y agotamiento y potenciando una respuesta citotóxica robusta que favorece el control del parásito en tejidos. De manera notable, el conocimiento de inmunología básica que se desprende de estos resultados podría ser extensivo a otras patologías infecciosas, autoinmunes o tumorales donde la respuesta inmune mediada por IL-17, así como la regulación de la inflamación y de la respuesta T CD8+, juegan roles relevantes. Más específicamente, estos hallazgos contribuyen a una mejor comprensión de los mecanismos inmunes involucrados en la resistencia a la infección con *T. cruzi* y el desarrollo de la patología (figura 46), y aportan información importante para el eventual desarrollo de vacunas o nuevas terapias.



**Figura 44. Mecanismos protectores de las citoquinas de la familia IL-17 en la infección con *T. cruzi*.** Durante la infección con *T. cruzi* se producen IL-17A, IL-17F, IL-17E y probablemente IL-17C. Estas citoquinas actuarían sobre células estromales en tejidos que expresan IL-17RA induciendo la liberación de las quemoquinas CXCL1 y CXCL2, las cuales atraen neutrófilos a los tejidos. Por su parte, los neutrófilos en contacto con el parásito liberan IL-10 que suprime la respuesta linfoproliferativa y la producción de citoquinas como IFN- $\gamma$  y TNF, controlando una inflamación exacerbada. Por otra parte, IL-17A y/o IL-17F (y quizás otras citoquinas de la familia IL-17) actúan directamente sobre los LiT CD8<sup>+</sup> manteniendo su sobrevida y funcionalidad (producción de IFN- $\gamma$  y TNF, degranulación). De esta forma los LiT CD8<sup>+</sup> controlan eficientemente los niveles de parasitismo tisular. Mientras tanto, la ausencia de IL-17RA tiene como consecuencia el disminuido reclutamiento de neutrófilos regulatorios productores de IL-10 y la reducida magnitud y funcionalidad de la respuesta citotóxica. Así, los animales que carecen de IL-17RA evidencian mayor inflamación (IFN- $\gamma$  y TNF) y daño tisular, así como también mayor parasitismo tisular. En conjunto, las citoquinas de la familia IL-17 son importantes en la resistencia a la infección con *T. cruzi* en tanto participan de la regulación de la inflamación y el control de la replicación parasitaria, previniendo la mortalidad en la etapa aguda y el desarrollo de la patología.

## MATERIALES Y MÉTODOS

## Animales de experimentación

Para los experimentos realizados en este trabajo de tesis se utilizaron los ratones salvajes o genéticamente modificados que a continuación se detallan.

- Ratones WT (del inglés, *Wild Type*): Ratones C57 *black* o C57BL/6 endocriados en nuestro Instituto a partir de progenitores suministrados por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Por sus características, es frecuente el uso de esta cepa como portadora de mutaciones espontáneas o inducibles. En relación a ello, constituyen trasfondo (*background*) genético de la mayoría de los ratones genéticamente modificados que se han empleado en este trabajo. Además, de relevancia para esta tesis, expresan el alelo CD45.2 en todas sus células de origen hematopoyético, y por lo tanto las células del sistema inmune son trazables mediante el empleo de anticuerpos específicos.
- Ratones IL-17RA KO (del inglés, *Knock Out*, KO): animales B.129.IL17RAKO fueron provistos por Amgen Inc. mediante acuerdo N° 200716544-002. Estos animales son deficientes en IL-17RA y por tanto son incapaces de señalar las citoquinas IL-17A, IL-17C, IL-17F e IL-17E [147, 148]. Además su *background* genético es C57BL/6 y sus células hematopoyéticas expresan CD45.2.
- Ratones IL-10 KO: Ratones B6.129P2-Il10tm1Cgn/J fueron adquiridos en The Jackson Laboratories (EEUU). En este caso, los animales tienen delecionado el gen de IL-10 y consecuentemente sus célula son incapaces de producir esta citoquina. Su *background* genético es C57BL/6 y expresan CD45.2.
- Ratones IL-17A/F KO o DKO: los animales IL-17A/IL-17F *double knockout mice* (Haas y col. [317]) se caracterizan por la deficiencia simultánea de IL-17A e IL-17F. Fueron suministrados gentilmente por el laboratorio del Dr. Immo Prinz (Universidad de Hannover, Alemania). Poseen el *background* genético C57BL/6 y sus células hematopoyéticas expresan CD45.2.
- Ratones WT CD45.1: los animales B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ, fueron adquiridos en The Jackson Laboratories (EEUU), tienen el *background* genético C57BL/6 pero sus células hematopoyéticas expresan en este caso CD45.1 y pueden trazarse mediante el uso de anticuerpos específicos. Las células de estos ratones son completamente funcionales y su comportamiento es comparable al de los animales WT.
- Ratones CD8<sup>-/-</sup> o CD8<sup>null</sup>: Animales B6.129S2-Cd8atm1Mak/J fueron adquiridos en The Jackson Laboratories (EEUU) se caracterizan por la ausencia de expresión de la molécula CD8a cuya principal consecuencia es una alteración total en el desarrollo de linfocitos T CD8+, que redunde en una ausencia total de esta población. Poseen el *background* genético C57BL/6 y sus células hematopoyéticas expresan CD45.2.

- Ratones WT CD45.1.2: A los fines de los experimentos de transferencias adoptivas, se cruzaron en el bioterio del instituto hembras CD45.1 con machos WT (CD45.2), de forma tal que la primera generación filial (F1) resultó heterocigota. Así los ratones F1 presentaron células hematopoyéticas que expresan simultáneamente CD45.1 y CD45.2. Las células de estos ratones fueron completamente funcionales y su *background* genético fue C57BL/6.
- Ratones BALB/C: animales de la cepa BALB/C fueron endocriados en nuestro Instituto a partir de progenitores provistos por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Su *background* o trasfondo genético fue BALB/C.

En este trabajo de tesis se utilizaron principalmente ratones hembras de 6-8 semanas de edad, criados en un ciclo de luz y oscuridad de 12 h. Los animales se mantuvieron en el bioterio del Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIBICI-CONICET) con el número de aprobación del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (*National Institutes of Health-USA, NIH*): A5802-01. Para su cuidado, se siguieron las recomendaciones de la guía para el cuidado y uso de animales de experimentación, publicada por el Consejo Canadiense de Protección de los Animales y aprobado por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (resolución HCD 274/09 y 981/13). Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo bajo estricta conformidad con las recomendaciones de la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del NIH.

## Reactivos

### 1. Reactivos químicos

Los medios de cultivo RPMI 1640 y *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), la solución tampón o *Buffer* Fosfato (PBS) pH 7.4, la L-glutamina (Glutamax), el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) fueron de marca Life Technologies (Reino Unido).

El 2-Mercaptoetanol, el PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, el *Tetramethylrhodamine, Ethyl Ester, Perchlorate* (TMRE), el *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE), el colorante 5-(and-6)-Carboxy SNARF-1, el agua *DNA ultrapure*, el *buffer* Tris-EDTA pH=8 y el TRIZOL fueron adquiridos en Molecular Probes, Invitrogen (USA).

El *buffer* para lisar glóbulos rojos (Tris-cloruro de amonio), el Percoll, el azul de tripán, la albúmina sérica bovina, la bromo-deoxi-uridina (BrDU), el inhibidor de proteasas, el forbol miristrato acetato (PMA), el forbol 12-13 dibutirato (PdBu) y la ionomicina se compraron en Sigma-Aldrich Chemical Co (EEUU).

Cabe mencionar también que la gentamicina utilizada fue de marca FABRA (Grand Islan, EEUU), mientras que la heparina libre de aditivos de 5.000 U/mL fue de marca UENFAR (Alemania). Por otro lado, la brefeldina y la monensina empleadas se compraron en eBiosciences (EEUU) y el HEPES se obtuvo de Cell Gro Corning (EEUU). Además el fijador histológico fue adquirido en BioPure Diagnostic (Argentina). Por otra parte, los Kits para la determinación de ALT y AST fueron de marca Wiener (Argentina), mientras que los reactivos de Bradford, el Tween-20 y los insumos empleados para electroforesis se compraron en BioRad (EEUU). La empresa BD Biosciences (EEUU) nos proveyó del reactivo TMB, los *buffers CytoFix/CytoPerm, Perm/Wash, BrdU Flow kit* y GolgiStop.

El ácido sulfúrico, el etanol, el cloroformo, el metanol, la hematoxilina, la eosina, el May-Grundwald y el Giemsa utilizados, fueron de las marcas Cicarelli (Argentina), Taurus (Argentina) y J.T.Backer Chemicals (EEUU); otros reactivos como cloruro de amonio, Tris, fosfato de sodio, cloruro de sodio, carbonato de sodio, glucosa fueron de marca Anedra (Nueva Zelanda).

Finalmente, los reactivos de biología molecular utilizados en la RT-PCR fueron de marca Promega (EEUU), mientras que los utilizados para la PCR en tiempo real se adquirieron en la empresa Applied Biosystem (EEUU).

**2. Anticuerpos para citometría de flujo:** Los experimentos desarrollados en el presente trabajo de tesis involucraron los anticuerpos conjugados a fluorocromos que se detallan a continuación.

Especificidad	Clon	Fluorocromo*	Marca comercial
CD11c	N418	PE	eBioscience
B220	RA3-6B2	Alexa Fluor 647	eBioscience
CD107a	eBio1D4B	PE	eBioscience
CD11b	M1/70	FITC	Biologend, eBioscience
CD122	TIM- $\beta$ 1	FITC	BD Bioscience
CD127	B12-1	Biotina	BD Bioscience
CD19	eBio 103	FITC	eBioscience
CD25	7D4	FITC	BD Bioscience
CD25	P61.5	PECy7	Biologend, eBioscience
CD3	145-2C11	PerCPCy5.5	BD Bioscience
CD4	RM4-5	PE, PerPCy5.5	eBioscience
CD44	IM7	Biotina, FITC	BD Bioscience, eBioscience
CD45.1	A20	Alexa Fluor 750, APCy7	BD Bioscience

CD45.2	104	PerCPCy5.5,	BD Bioscience
CD62L	MEL-14	PE	BD Bioscience, eBioscience
CD8	53-6.7	FITC, PECy7	Biolegend, eBioscience
CTLA-4	UC10-4B9	PE	eBioscience
F4/80	BM8	APC	Biolegend
FAS (CD95)	Jo2	PE, Biotina	BD Bioscience
Gr-1	RB6-8C5	Alexa Fluor 750	eBioscience
IFN- $\gamma$	XM61,2	APC, FITC	BD Bioscience, eBioscience
IL-10	D7	PE	BD Bioscience
IL-12p40/70	C15.6	PE	BD Bioscience
IL-17A	TC11-18H10	PE	BD Bioscience
IL-17F	eBio18F10	APC	eBioscience
IL-6	MP5-20F3	PE	BD Bioscience
KLRG1	2F1/KLRG1	PE	eBioscience
LAG-3	C9B7W	PerCPCy5.5,	eBioscience
Ly6C	HK1.4	PerPCy5.5	eBioscience
Ly6G	1A8	PECy7	Biolegend, eBioscience
NK1.1	PK136	Alexa Fluor 647	eBioscience
PD1	RMP1-30	PE, PECy7	Biolegend, eBioscience
TIM-3	B8.2C12	PE	Biolegend
TIM-3	RMT3-23	APC	eBioscience
TNF	MP6-XT22	APC, PerCP	BD Bioscience
Estreptavidina		PECy7, PerCPCy5.5, APC	Biolegend, eBioscience

(\*) APC: Allofocianina; FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PECy7: Ficoeritrina conjugada con cianina; PerCP: Proteína clorofila peridinina; PerCPCy5.5: Proteína clorofila peridinina conjugada con cianina.

### 3. Anticuerpos para tratamientos neutralizantes

- **In-vitro:** Anticuerpo bloqueante anti IL-10R (Purified NA/LE Rat Anti-Mouse CD210, Clone 1B1.3a, BD Biosciences).

- **In-vivo:**

Anticuerpo anti IFN- $\gamma$ : Purificado de sobrenadantes de cultivo del hibridoma productor de anticuerpos de rata IgG que reconocen IFN- $\gamma$  de ratón (R4-6A2). Esta línea celular se cultivó según se detalla en la sección "Cultivo celular". El anticuerpo fue enriquecido a través de cromatografía de afinidad de

proteína G, utilizando *HiTrap Protein G columns* (GE Healthcare) acoplada a HPLC (Hewlett-Packard 1100 HPLC), según indicaciones del fabricante. Se llevaron a cabo controles de pureza que incluyeron electroforesis SDS-PAGE y ELISA (donde se utilizó como anticuerpo de sensibilización en combinación con demás reactivos del *kit* de ELISA para la determinación de IFN- $\gamma$ , eBiosciences). Su concentración se determinó a través de la técnica de Bradford.

Anticuerpo anti Ly6G: Anticuerpo de rata IgG2a específico para Ly6G de ratón (clon 1A8) provisto por BioXCell. Se ha reportado que este anticuerpo tiene la propiedad de unirse específicamente a neutrófilos y a través de variados mecanismos, reducir la cantidad de estas células [318].

Anticuerpo IgG2a de rata: El anticuerpo IgG2a de rata (control) fue adquirido en Jackson ImmunoResearch (EEUU).

#### 4. Antígenos

- TSKB20 (ANYKFTLV): Provisto por la empresa Genscript Inc. Epitope de la enzima transialidasa del parásito *T. cruzi* [253].
- PA8 (VNHRFTLV): Provisto por la empresa Genscript Inc. Epitope de la proteína de superficie del amastigote (ASP, de sus siglas en inglés *amastigote surface protein*)-2 de *T. cruzi* [252].

#### 5. Tetrámeros

- TSKB20/H-2k(b): Tetrámero de H-2k (CMH-I de la cepa C57BL/6) conjugado con el péptido TSKB20 y el fluorocromo APC (NIH Tetramer Core Facility).
- PA8/H-2k(b): Tetrámero de H-2k (CMH-I de la cepa C57BL/6) conjugado con el péptido PA8 y el fluorocromo APC (NIH Tetramer Core Facility).

6. **Líneas celulares**: Hibridoma productor de anticuerpo anti-IFN- $\gamma$  (clon R4-6A2) y línea celular de fibroblastos NIH3T3 (NIH).

#### 7. Reactivos de ELISA (anticuerpos y recombinantes)

- Reactivos para la determinación de citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10 IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17E fueron provistos por eBiosciences (EEUU) en el formato *Anti-mouse ELISA Ready-SET-Go!* que incluye: Anticuerpos de captura (*purified*), recombinantes, anticuerpos biotinilados, y estreptoavidina conjugada con peroxidasa.
- Kits reactivos para la determinación de CXCL-2 (MIP-2) y CXCL10 (IP-10) fueron comprados en la empresa Preprotech.

- En los anteriores casos, se utilizaron placas Costar *high binding half area* de la empresa Fisher scientific (EEUU). Demás reactivos químicos (TMB, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sales para buffers de sensibilización) fueron incluidos en la correspondiente sección.

#### 8. Reactivos para ensayos multiplex por citometría de flujo

- La determinación de IL-17A e IL-17F se realizó con el sistema FlowCytomix™ Multiple Analyte Detection System de la empresa eBiosciences (EEUU).
- La cuantificación de CXCL-1 y G-CSF se realizó utilizando los ensayos BD™ Citometric-Bead Array (CBA) de la marca BD Biosciences (EEUU).

#### 9. Perlas magnéticas y columnas para separación magnética

Los kits comerciales de purificación con perlas magnéticas *Anti-Ly-6G MicroBead Kit mouse* y *Anti-Ly-6G MicroBead Kit* y *CD8α<sup>+</sup> T Cell Isolation kit II* fueron provistos por la empresa Miltenyi Biotec (EEUU), al igual que las columnas LS, el magneto y los adaptadores.

### Parásitos e infección

#### 1. Mantenimiento de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* y obtención de tripomastigotes de sangre de ratón

Los tripomastigotes de la cepa Tulahuén se mantuvieron a través de pase del parásito en ratones BALB/c machos. Se infectaron intraperitonealmente dos animales con  $1.10^6$  de parásitos contenidos en 200uL de PBS. A los 10-11 días, la sangre de éstos animales sirvió como fuente de tripomastigotes para sostener el pase e infectar a los ratones según el modelo experimental propuesto.

#### 2. Mantenimiento de la cepa Y de *T. cruzi* y obtención de tripomastigotes de sobrenadante de cultivo

Los tripomastigotes de la cepa Y-Br se mantuvieron en cultivos de la línea celular de fibroblastos NIH3T3.  $5.10^5$  células NIH3T3, fueron cultivadas durante una noche a 37°C en un Flask T25. Al día siguiente las células en una confluencia del 40-50%, se infectaron con  $1,7.10^6$  tripomastigotes y se cultivaron otras 48 h a 37°C. Al día 4, se les cambió el medio y se las puso en cultivo a 34°C. El medio fue periódicamente cambiado (cada 48hs), hasta el día 6-7 cuando se recolectó el sobrenadante que contenía los parásitos. Este sobrenadante fue centrifugado 5 minutos (min) a 500rpm, y se recuperó el sobrenadante (conteniendo a los parásitos) y se repitió la operación como modo para quitar los residuos celulares. Posteriormente este mismo sobrenadante fue centrifugado 20 min a 4400rpm, tras los cuales los parásitos se depositaron en el fondo

del tubo. Se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet, que fue lavado con PBS al 1% de glucosa a 37°C y centrifugado 20 min a 4400rpm. Finalmente se resuspendieron los parásitos en PBS al 1% de glucosa y se contaron los tripomastigotes móviles en cámara de Neubauer. Los parásitos así recuperados sirvieron tanto para continuar otro ciclo de infección de las células NIH3T3, como para infectar a los ratones de acuerdo al modelo propuesto.

### 3. Infección con *T. cruzi*

Ratones C57BL/6 WT o genéticamente modificados, fueron infectados de forma intraperitoneal con 5.000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén diluidos en 200uL de PBS, o 10.000 de la cepa diluidos en PBS al 1% de glucosa (figura 45). En ciertos experimentos particulares se utilizaron otras dosis que se especificaron tanto en el texto como en la leyenda de la figura. Las dosis de parásito fueron seleccionadas de forma que la mayoría

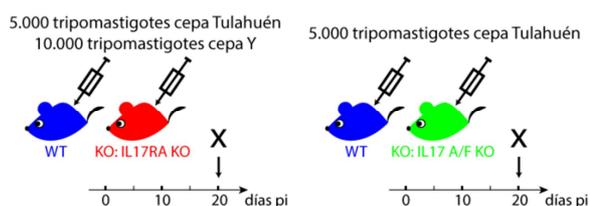
de los ratones WT sobreviven la etapa aguda de infección y progresan a la cronicidad. Según el caso, los animales se sacrificaron a distintos tiempos de infección para realizar estudios en distintos órganos, o bien se controlaron periódicamente a fines de establecer su sobrevida y progresión a la infección. Ratones no infectados se utilizaron como control en muchos de los experimentos, según se indica en cada caso.

### 4. Determinación de la parasitemia

Para la determinación de la parasitemia, se contaron en cámara de Neubauer los tripomastigotes móviles presentes en una dilución 1/10 o 1/20 de la muestra de sangre con una solución de cloruro de amonio al 0.87% que lisa los glóbulos rojos.

### 5. Monitoreo de la infección aguda

Los controles de sobrevida se realizaron generalmente cada 48 h y cada 24 h en tiempos cercanos al pico de parasitemia (día 20 pi). También se evaluó el estado general de los animales. Según las normas de cuidado de animales, los ratones que mostraron una pérdida del peso corporal de más del 20% del peso original fueron sacrificados.



**Figura 45. Modelo de infección.** Ratones WT e IL-17RA KO fueron infectados intraperitonealmente con 5.000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén o 10.000 tripomastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*, mientras que animales IL-17A/F DKO y sus controles WT se infectaron con 5.000 de la cepa Tulahuén.

## 6. Obtención de tripomastigotes (Cepa Tulahuén) de sangre de ratón

La sangre de ratones infectados para pase se centrifugó durante 10 min a 2200 rpm para separar la masa globular del suero y se colocó durante 2 h en estufa de 37°C. Durante el tiempo transcurrido, los parásitos móviles migraron de la zona globular al suero. Posteriormente se separó el suero rico en tripomastigotes y se centrifugó a 13.000rpm por 10 min. El *pellet* de parásitos se lavó dos veces con RPMI siguiendo el mismo proceso de centrifugación a altas velocidades y luego se resuspendió en RPMI completo. La cuantificación de los mismos se realizó en cámara de Neubauer.

### Tratamiento *in-vivo* de ratones

En aquellos tratamientos que requirieron inyecciones endovenosas a repetición se alternaron ambos ojos de los ratones, de acuerdo a recomendaciones para el cuidado de animales de experimentación

#### 1. Tratamiento neutralizante de IFN- $\gamma$

La neutralización de IFN- $\gamma$  se realizó a través de la inyección intraperitoneal de 250ug de un anticuerpo IgG anti IFN- $\gamma$  (clon R4-6A2), contenidos en 200uL de PBS estéril. El esquema de tratamiento consistió en 4 inyecciones a los días: 9, 12, 15 y 18 pi. El grupo de ratones control fue inyectado de manera intraperitoneal, con 250ug de IgG de rata con especificidad no relacionada (en 200uL de PBS estéril), siguiendo el mismo esquema de tratamiento. La efectividad de la neutralización fue determinada al día 20 pi, a través de la cuantificación de IFN- $\gamma$  en plasma. La parasitemia y la actividad de transaminasas hepáticas (determinadas al día 20 pi), así como la sobrevivencia, se utilizaron como indicadores del efecto del tratamiento. La cinética de neutralización, relativamente demorada respecto del comienzo de la infección, permitió a los ratones desarrollar una respuesta temprana de IFN- $\gamma$  (necesaria para el control temprano del parásito) y se mostró eficiente en disminuir las altas concentraciones de esta citoquina en días críticos para el balance entre respuesta inflamatoria y regulatoria.

#### 2. Tratamiento de depleción de neutrófilos

Ratones WT e IL-17RA KO infectados fueron inyectados en el seno retro-orbital (vía endovenosa) con 250 ug de un anticuerpo IgG anti-Ly6G (clon 1A8) contenidos en 100uL de PBS estéril. El esquema de tratamiento consistió en cuatro inyecciones del anticuerpo, efectuadas a los días 9, 12, 15 y 18 pi. Como control, se trataron de igual modo, 250 ug de IgG de rata con especificidad no relacionada. A los 20 días de infección (2 días después de la última inyección), algunos animales fueron sacrificados mientras que a otros se les monitoreó la sobrevivencia. Para determinar la eficiencia de la depleción se evaluó, por citometría de flujo, la

presencia de neutrófilos (CD11b+Gr1+Ly6G+) en bazo, hígado y sangre de los animales sacrificados. Para determinar el efecto biológico del tratamiento, se evaluó la producción de IL-10 por células de bazo e hígado, las concentraciones plasmáticas de IFN- $\gamma$ , la actividad de enzimas hepáticas, la parasitemia y sobrevida. El esquema de inyecciones escogido permitió una respuesta temprana de neutrófilos, importante para contener la infección inicial, a la vez que posibilitó la disminución consistente de neutrófilos en el período de tratamiento.

### **3. Transferencia adoptiva de neutrófilos**

- **Estudio de reclutamiento de neutrófilos a tejidos**

El reclutamiento de neutrófilos a distintos tejidos se ensayó a través de transferencia endovenosa de células marcadas con moléculas fluorescentes y su posterior cuantificación en órganos. Células Ly6G+ (Neutrófilos) de médula ósea de un *pool* de ratones WT e IL-17RA KO no infectados, fueron purificadas por selección positiva con perlas magnéticas. Posteriormente, los neutrófilos WT fueron teñidos con el colorante vital CFSE, mientras que los neutrófilos IL-17RA KO fueron teñidos con el colorante vital SNARF-1. Ambos colorantes pueden ser distinguidos entre sí ya que emiten fluorescencia en distintos canales/detectores). Iguales cantidades ( $5 \cdot 10^6$  células) de neutrófilos WT/CFSE y KO/SNARF-1 resuspendidos en 100uL de PBS fueron transferidos simultáneamente y de forma endovenosa (seno retro-orbital) a animales WT e IL-17RA KO normales o infectados al día 20 pi con *T. cruzi*. A las 3hs, los animales fueron sacrificados y sus distintos órganos y tejidos se analizaron por citometría de flujo. La presencia de neutrófilos WT/CFSE y KO/SNARF-1 fue evaluada en sangre, médula ósea, bazo e hígado. Es importante mencionar que se eligió, para realizar estos ensayos, el día 20 pi porque además de ser un día clave para los estudios de esta tesis, coincide con el pico de parásitos y quemoquinas en sangre (citar figuras de las cinéticas de parasitemia y quemoquinas).

- **Estudios la capacidad protectora de los neutrófilos en la infección**

La protección mediada por neutrófilos se ensayó transfiriendo adoptivamente estas células en ratones WT e IL-17RA KO infectados y analizando la progresión de la infección. Los neutrófilos fueron purificados por selección positiva de médula ósea de animales WT no infectados utilizado perlas magnéticas específicas para Ly6G. Posteriormente, ratones WT e IL-17RA KO infectados recibieron cuatro inyecciones endovenosas, conteniendo cada una  $5 \cdot 10^6$  neutrófilos en 100uL de PBS. Las transferencias tuvieron lugar a los días 9, 12, 15, 18 pi. Como controles se utilizaron animales WT e IL-17RA KO infectados que recibieron, bajo el mismo esquema, inyecciones de 100uL de PBS. Para determinar el efecto biológico del tratamiento, se evaluaron las concentraciones plasmáticas de IFN- $\gamma$ , la parasitemia y sobrevida. Las inyecciones se realizaron cada 3

días considerando la corta vida media de los neutrófilos transferidos. El tratamiento fue relativamente tardío en la progresión de la infección porque se pretendió evaluar el rol de los neutrófilos en la modulación de la actividad adaptativa.

- **Estudio comparativo del efecto de la transferencia de neutrófilos WT y IL-10KO**

La comparación de la capacidad protectora de neutrófilos WT con la de neutrófilos incapaces de producir IL-10 (IL-10KO), tuvo lugar a través de la transferencia con uno u otro tipo de célula en ratones WT infectados. Específicamente,  $2 \cdot 10^6$  neutrófilos WT o IL-10 KO purificados por selección positiva a partir de médula ósea de ratones WT o IL-10 KO fueron transferidos de manera endovenosa (seno retro-orbital) en ratones WT infectados con *T. cruzi*. Se utilizó exactamente el mismo diseño experimental y análisis que en el experimento descrito en el párrafo anterior. Se transfirieron sólo hospedadores WT porque, en experimentos previos, los ratones IL-17RA KO mostraron baja capacidad de reclutar neutrófilos transferido

#### 4. Transferencias adoptivas de linfocitos T CD8+

- **Evaluación del papel de la señalización de IL-17RA intrínseca en el mantenimiento de los linfocitos T CD8+**

En primer lugar, se realizaron ensayos destinados a evaluar la contribución de células T CD8+ inyectadas a la respuesta CD8 total en ratones WT e IL-17RA KO inmunocompetentes. Para ello, se realizó la transferencia adoptiva de  $3 \cdot 10^6$  linfocitos T CD8+ purificados de bazo de animales WT CD45.1 por selección negativa con perlas magnéticas en el seno retro-orbital de hospedadores inmunocompetentes WT (CD45.2) e IL-17RA KO (CD45.2). Inmediatamente después los animales fueron infectados con *T. cruzi* y a los 20 días pi se sacrificaron. La contribución de las células transferidas o exógenas (CD45.1+) respecto de la población endógena (CD45.2+), se evaluó por citometría de flujo en bazo.

Como alternativa, se realizaron experimentos transferencia adoptiva competitiva que implicaron la inyección simultánea de linfocitos T CD8+ de ratones WT e IL-17RA KO en hospedadores WT inmunocompetentes. Luego de su purificación por selección negativa con perlas magnéticas,  $3 \cdot 10^6$  de células T CD8 CD45.1 (WT) y  $3 \cdot 10^6$  de las células T CD8+ CD45.2 (IL-17RA KO) (relación 1:1) contenidos en 100uL de PBS, fueron inyectados en ratones CD45.1.2 (F1 CD45.1xCD45.2). Alternativamente y según se indica en el texto y las respectivas leyendas de las figuras, se utilizaron como hospedadores ratones CD8a<sup>-/-</sup>. Inmediatamente después de la transferencia, los ratones hospedadores fueron infectados como antes se

detalla. A distintos días se la relación entre células CD45.1+ y CD45.2+ fue determinada en sangre, bazo e hígado.

- **Ensayos de protección**

Los ensayos de protección involucraron ratones CD8a<sup>-/-</sup> que carecían de células T CD8+ endógenas. 7.10<sup>6</sup> de células T CD8+ purificadas de bazo de animales WT e IL-17RA KO no infectados, fueron transferidas de forma independiente en distintos grupos de ratones CD8a<sup>-/-</sup>. Inmediatamente después, los animales fueron infectados intraperitonealmente con 200 tripomastigotes contenidos en 200uL de PBS. Es relevante mencionar que la gran susceptibilidad ratones CD8a<sup>-/-</sup> frente al parásito requirió utilizar un modelo de infección con un número notablemente menor de tripomastigotes que el usual. Al primer día post-infección, se tomó una muestra de sangre de todos los animales, en donde se evaluó el porcentaje de células T CD8+ transferidas como control de transferencia equiparable.

## Muestras de sangre y suero

### 1. Sangre

La sangre de ratones a distintos tiempos de infección y controles no infectados, fue recolectada a partir del seno venoso retro-orbital utilizando pipetas *Pasteur* de vidrio en presencia de 10uL de heparina.

### 2. Suero

Para la determinación de enzimas o citoquinas en plasma, la sangre se centrifugó 5 min a 2500 revoluciones por minuto (rpm). Se separó luego el plasma del paquete globular y se conservó a -80 °C hasta su análisis.

## Lisados celulares

Para la determinación de quemoquinas y G-CSF, bazo e hígado de ratones WT e IL-17RA KO a distintos tiempos de infección fueron homogeneizados en PBS que contenía 0.5% albúmina sérica bovina, 0,4M de NaCl, 1mM de EDA, 0,05% Tween 20 y una mezcla de inhibidores de proteasas. Posteriormente, el lisado fue centrifugado a 10000g por 10 min y los sobrenadantes fueron recolectados y analizados para los distintos analitos. Los resultados fueron normalizados a la cantidad total de proteínas. La técnica fue adaptada de Souza y col. [319].

## Suspensiones celulares

### 1. Células de bazo

Una vez sacrificados los animales, se extrajeron distintos órganos en esterilidad. Los bazos se colocaron sobre mallas metálicas de acero inoxidable alojadas dentro de cápsulas de Petri de 30mm conteniendo 3mL de PBS (GIBCO) al 2%SBF. Con ayuda de émbolos estériles, estos tejidos se disgregaron mecánicamente, formando suspensiones celulares que se centrifugaron 5 min a 2000 rpm. Con fines de destruir los glóbulos rojos, los *pellets* celulares fueron tratados con 3mL de *buffer* de lisis (*buffer* Tris-HCl, pH=7,5, a una concentración de 8,3g/L de NH<sub>4</sub>Cl, Sigma). Transcurridos 5 min, se agregaron 7mL de PBS-SBF2% para inactivar la lisis y los leucocitos resultantes se lavaron dos veces (cada lavado consistió en agregar PBS-SBF 2%, centrifugar 5 min a 2000 rpm y descartar el sobrenadante). Finalmente las células se resuspendieron en PBS-SBF 2% y se mantuvieron en hielo hasta su uso. La cantidad de leucocitos viables se determinó contando en cámara de Neubauer una dilución de las células en el colorante vital Azul de Tripán (GIBCO).

### 2. Células de hígado

Los hígados se colocaron mallas metálicas de acero inoxidable alojadas dentro de cápsulas de Petri de 60mm conteniendo 6mL de PBS al 2%SBF. Con ayuda de émbolos estériles, estos tejidos se disgregaron mecánicamente, formando suspensiones celulares que fueron centrifugadas 5 min a 2000 rpm. Se lisaron los glóbulos rojos igual que en el bazo (utilizando en este caso sólo 1mL de *buffer* de lisis) y posteriormente se realizó una separación de leucocitos por gradiente de densidad de Percoll (Sigma). El *pellet* de células obtenido tras la lisis y los lavados, se resuspendió en 4mL de Percoll al 35% en RPMI y se depositó cuidadosamente sobre 2,5mL de Percoll al 70% en PBS. Los gradientes resultantes se centrifugaron 20 min a 600g, sin aceleración ni freno, y a temperatura ambiente. Se descartó la fase superior (residuos celulares) y se conservó la interface donde se ubicaron los leucocitos. Los leucocitos así obtenidos se lavaron dos veces y se preparó la suspensión celular de igual modo que la de bazo.

### 3. Células de ganglios linfáticos subcutáneos

Los ganglios linfáticos subcutáneos se colocaron sobre mallas metálicas de acero inoxidable en cápsulas de Petri de 30mm conteniendo 3mL de PBS al 2%SBF. Con ayuda de émbolos estériles, estos tejidos se disgregaron mecánicamente, formando suspensiones celulares que se centrifugaron 5 min a 2000 rpm. Las suspensiones celulares se lavaron dos veces para eliminar residuos lipídicos y se resuspendieron igual que bazo.

#### 4. Células de médula ósea

Una vez sacrificado el animal, se separaron tibias y fémures del tejido muscular. Seguidamente, se cortaron con tijera ambos extremos de estos huesos y se obtuvo la médula ósea mediante lavados con presión moderada con 2 ml de PBS-SBF 2% utilizando una jeringa de tuberculina (1mL desde cada extremo del hueso). La suspensión celular obtenida de cada hueso (fémur y tibia) se recolectó en un único tubo, se centrifugó y sometió a lisis de la misma forma que a las células del bazo. Los leucocitos resultantes se lavaron dos veces y se resuspendieron de modo convencional.

### Cultivos celulares y sobrenadantes de cultivo

#### 1. Cultivos primarios y sobrenadantes de cultivo

Para cultivo celular, las suspensiones celulares se centrifugaron y, según se indica en cada caso, se llevaron a una concentración desde  $2 \cdot 10^6$ /mL a  $20 \cdot 10^6$ /mL en RPMI completo (RPMI al 10% de SBF, 0,002M de L-glutamina, 50uM de 2-mercaptoetanol, y 40ug/mL de gentamicina). Según las particularidades de cada experimento y como se indica en las leyendas de las figuras, las células se cultivaron a lo largo de un número variable de h, en medio solo o en presencia de distintos estímulos. Los cultivos se hicieron a una atmósfera constante de 5% de CO<sub>2</sub> y 37 °C. En todos los casos, con excepción del estímulo anti-CD3/ anti-CD28, se utilizaron placas fondo en U de 96 pocillos con capacidad de 200uL/pocillo. Cuando fueron requeridos, los sobrenadantes de tales cultivos, se recolectaron en placas de 96 pocillos y se conservaron a -80 °C hasta su análisis.

- Estímulos con PMA/Ionomicina (citometría intracelular, cultivo 5hs): 0,1ug/mL PMA (Sigma) y 0,5ug/mL Ionomicina (Sigma) en presencia de brefeldina A (eBiosciences), monensina (eBiosciences), o GolgiStop (BD Biosciences)
- Estímulos con bajas dosis de PMA/Ionomicina (sobrenadante de cultivo, cultivos de 48hs): 10nM PMA (Sigma) y 0,5ug/mL Ionomicina (Sigma).
- Estímulos con anticuerpo anti-CD3 y PdBU (sobrenadante de cultivo, cultivos de 48hs): 2ug/mL anti-CD3 soluble (BD Biosciences) y 50mM PdBU (Sigma).
- Estímulos con PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (sobrenadante de cultivo, cultivos de 48hs): 1ug/mL (Invitrogen)
- Estímulos con anticuerpos anti-CD3/ anti-CD28 (ensayo supresión, cultivos de 5 días): 2ug/mL de cada uno (BD Biosciences). En este caso se sensibilizaron las placas fondo plano de 96 pocillos con 50uL de la

dilución de anticuerpos en PBS, a 4°C durante toda la noche. Poco a los cultivos, las placas se lavaron dos veces con PBS.

- Estímulos con tripomastigotes vivos (sobrenadante de cultivo, cultivos de 48hs): Neutrófilos fueron estimulados en una relación 1:1 con tripomastigotes vivos de la cepa Tulahuén.
- Estímulos con péptidos (TSKB20 y PA8) de proteínas de *T. cruzi* (citometría intracelular, cultivos 5hs): para estudios de funcionalidad, los linfocitos T CD8+ fueron estimulados con 5ug/mL de TSKB20 (Genscript Inc.), en el caso de ratones infectados con la cepa Tulahuén; y alternativamente con 5ug/mL de PA8 (Genscript INC.) en el caso de ratones infectados con la cepa Y. Estos cultivos se hicieron en presencia de brefeldina A o monensina (eBiosciences).

## 2. Cultivos de líneas celulares

- Hibridoma productor de IFN- $\gamma$  (clone R4-6A2): Este hibridoma se mantuvo en RMPI completo con HEPES (Cell gro) 25mM en estufa a 37°C y a una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados sistemáticamente cada 7 días y almacenados a -20°C para su posterior concentración y purificación (ver sección Reactivos, Anticuerpos para tratamientos).
- Línea celular de fibroblastos NIH3T3: Esta línea celular se mantuvo en cultivo en DMEM suplementado con 10% SBF (PAA) y 0,002M de L-glutamina, hasta el 90% de confluencia (en estufa a 37°C y a una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>). Para su repique fueron tratadas con Tripsin-EDTA 0.25% (Gibco).

## Purificación de poblaciones celulares

### 1. Cell sorting

Las suspensiones celulares obtenidas según los procedimientos descritos previamente, se centrifugaron y lavaron dos veces con MACS *buffer* (PBS suplementado con 2mM de EDTA y 0,5% de SBF y filtrado con filtro 0,22um). Posteriormente, las células fueron contadas con Azul de Tripán en cámara de Neubauer y diluidas a una densidad de  $500 \cdot 10^6$  de células/mL en MACS *buffer*. A esta suspensión se le agregaron los anticuerpos requeridos y se la incubó a 4 °C por 20 min. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron 2 veces con MACS *buffer*, se resuspendieron en una densidad de  $50 \cdot 10^6$  células/mL en el mismo buffer y se filtraron con un *cell strainer* de 0.40um (Falcon Corning Brand, EEUU) para evitar agregados celulares. Las poblaciones de interés fueron obtenidas por *fluorescence-activated cell sorting* en un equipo FACS Aria Cell Sorter (BD Biosciences). Las células purificadas se recolectaron en tubos estériles conteniendo 1-2 mL de RMPI completo con una concentración doble de SBF y gentamicina (20% y 40ug/mL respectivamente). En todos

los casos la pureza de las poblaciones fue mayor al 98%. Tras 2 lavados, las células se resuspendieron en 2mL de RPMI completo a una concentración doble de gentamicina (40ug/mL) y se dejaron 30 min en estufa a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo, se cuantificaron las células viables contando en cámara de Neubauer con el colorante vital Azul de Tripán.

Para la purificación de neutrófilos (CD11b+Gr1+), células NK (NK1.1+CD3-), células T CD8+ (CD8+CD3+), Células T CD4+ (CD4+CD3+) y fracción negativa (ninguna de las anteriores) se utilizó una tinción multiparamétrica con CD11b-FITC, CD4-PE, CD8-PECy7, CD3-PerCPCy5.5, NK1.1 Alexa fluor 647, Gr1- Alexa fluor 750. Mientras tanto, para el enriquecimiento de linfocitos T CD8+ (CD8+CD3+) se utilizó la tinción con CD8-PECy7 y CD3-PerCPCy5.5.

## 2. Perlas magnéticas

Una vez obtenidas las células de médula ósea según procedimientos descritos previamente, se realizó la purificación de neutrófilos por selección positiva utilizando el kit *Anti-Ly-6G MicroBead Kit mouse* (Miltenyi Biotec), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Por otro lado, se purificaron linfocitos T CD8+ de bazo por selección negativa utilizando el kit *Anti-Ly-6G MicroBead Kit y CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> T Cell Isolation kit II* (Miltenyi Biotec), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Marcación de células con colorantes vitales

Las distintas poblaciones de células a teñir fueron lavadas y diluidas a una densidad de 20.10<sup>6</sup> células/mL con PBS-SBF 1%. A esta suspensión celular se le agregó igual volumen de una solución de CFSE o de SNARF-1, según corresponda. Las concentraciones de las soluciones de CFSE variaron de acuerdo al tipo de ensayo y fueron 0.5uM para los ensayos de supresión, 1uM para los ensayos de reclutamiento de neutrófilos, 2 y 20uM para los ensayos de citotoxicidad in vivo. Mientras tanto la concentración de SNARF-1 fue de 1uM (ensayo de reclutamiento de neutrófilos). La mezcla células/colorante vital a la concentración indicada, fue incubada por 8 min a 37°C, y posteriormente se agregó 1 ml de RPMI completo gota a gota para inactivar la tinción. Las células marcadas fueron posteriormente lavadas con RPMI completo y se mantuvieron en reposo durante 30 min a 37°C antes de su recuento en cámara de Neubauer con azul de tripán. Con objeto de transferirlas a ratones vivos, se las lavó 3 veces con PBS y se las llevó a la densidad especificada.

## Ensayos celulares

### 1. Determinación de moléculas de superficie por citometría de flujo

El *pellet* de  $2 \times 10^6$  de células fue resuspendido en 20  $\mu$ L de PBS-SBF 2% conteniendo las diluciones apropiadas de los anticuerpos conjugados a fluorocromos específicos para distintas moléculas de superficie a determinar,. Luego de 20 min de incubación, las células fueron lavadas y resuspendidas en PBS al 2% de SBF. Finalmente se adquirieron en un citómetro de flujo *FACS Canto II (BD Biosciences)* y se analizaron en este y todos los casos con el software *FlowJo*.

### 2. Determinación de moléculas intracelulares por citometría de flujo

La determinación de citoquinas intracelulares se realizó por citometría de flujo luego del cultivo de  $2 \cdot 10^6$  células con inhibidores del transporte vesicular (monensina, brefeldina o GolgiStop) en presencia/ausencia de los estímulos apropiados. Los estímulos utilizados se especifican en las leyendas de las figuras y en la sección "Cultivos Celulares". Transcurridas 5 h de cultivo, las células fueron lavadas y teñidas de forma superficial con anticuerpos requeridos para identificar las distintas subpoblaciones, como se indica en cada caso. Finalmente, las células fueron lavadas, fijadas y permeabilizadas con los *buffers* comerciales *Cytofix/Cytoperm* y *Perm/Wash (BD Biosciences)*, siguiendo instrucciones del fabricante. La tinción con los anticuerpos específicos para moléculas intracelulares, se hizo a temperatura ambiente en *Perm/Wash*, por un período de 30 a 60 min. Tras un último lavado, tuvo lugar la adquisición de las células en el citómetro de flujo.

### 3. Determinación por citometría de flujo de la actividad supresora de los neutrófilos

El ensayo de actividad supresora de neutrófilos consistió en evaluar la proliferación de esplenocitos normales en presencia o ausencia de neutrófilos WT e IL-17RA KO. Específicamente, esplenocitos de ratones WT fueron teñidos con 0,5  $\mu$ M de CFSE. Mientras tanto neutrófilos de bazo fueron identificados como CD11b+Ly6G+ y purificados a través de *Cell Sorter*.  $5 \cdot 10^5$  células esplénicas teñidas con CFSE y estimuladas con anticuerpos anti-CD3 + anti-CD28 (2  $\mu$ g/mL cada uno), fueron cultivadas durante 5 días, solas o en presencia de  $1 \cdot 10^5$  neutrófilos WT o IL-17RA KO. Asimismo, en algunos cultivos se neutralizó IL-10 con 10  $\mu$ g/mL de anticuerpo anti-IL-10R. Transcurrido el tiempo de cultivo, se evaluó por citometría de flujo la dilución de CFSE como medida de la proliferación celular, así como la producción de IFN- $\gamma$  en las células CD3+. Los datos de proliferación celular se normalizaron a la condición basal: esplenocitos cultivados en ausencia de neutrófilos y de anticuerpos anti-IL-10R (100% de proliferación).

#### 4. Cytospin (caracterización morfológica de neutrófilos)

Neutrófilos de bazo e hígado, purificados por la técnica de *cell sorting* fueron lavados dos veces con PBS al 2% de SBF y llevados a una concentración de  $20 \cdot 10^5$  células/mL, con el mismo *buffer*. 100uL de esta suspensión celular se colocaron en los adaptadores (pocillo, papel secante y vidrio tipo porta) de la citocentrífuga que se puso en funcionamiento por 6-7 min a velocidad intermedia. Los vidrios donde las células se depositaron, se dejaron secar durante la noche y al otro día se fijaron y tiñeron con May-Grunwald/Giemsa siguiendo protocolos estándares.

#### 5. Ensayo de citotoxicidad *in vivo* por citometría de flujo

Células de bazo de ratones WT no infectados fueron pulsadas mediante un cultivo de 1 h en RPMI completo en presencia de 1ug/mL de los péptidos de *T. cruzi* (TSKB20 o PA8 según se indique) (células blanco). Al mismo tiempo, esplenocitos WT fueron cultivados en ausencia de péptido (células control). Luego del cultivo, las células blanco y controles se lavaron dos veces con PBS y se tiñeron con CFSE a una concentración de 20uM y 2uM respectivamente. Terminado el protocolo de tinción, las células blanco caracterizadas por una alta tinción con CFSE (CFSE-alto) y las células control identificadas por una baja tinción con CFSE (CFSE-bajo), se mezclaron en una proporción 1:1 y se inyectaron en el seno retro-orbital de ratones WT e IL-17RA KO a diferentes puntos de infección según se indica. Ratones no infectados fueron inyectados con la misma mezcla como control. Los ratones fueron sacrificados 18 h después de la transferencia. Los porcentajes de células CFSE-alto y CFSE-bajo con alta y baja tinción con CFSE en la población CFSE+ fue determinada en bazo mediante citometría de flujo. La frecuencia de muerte se calculó según la siguiente fórmula:

iCFSE-alto: % de células blanco en ratones infectados.

iCFSE-bajo: % de células control en ratones infectados.

nCFSE-alto: % de células blanco en ratones no-infectados.

nCFSE-bajo: % de células control en ratones no-infectados.

$$\% \text{ de muerte} = 100 - \frac{(iCFSE\text{-alto}) / (iCFSE\text{-bajo})}{(nCFSE\text{-alto}) / (nCFSE\text{-bajo})} \times 100$$

## 6. Ensayos de proliferación celular con BrdU por citometría de flujo

Para evaluar la proliferación celular de células T CD8+ totales o específicas para TSKB20 se realizaron ensayos de incorporación de BrdU. Para ello, a ratones WT e IL-17RA KO infectados se les ofreció agua de beber suplementada con BrdU (1ug/mL) en una solución de sucrosa 1% cuidadosamente protegida de la luz. Tras cinco días de bebida *ad libitum* de esta solución, los ratones fueron sacrificados y sus células de bazo fueron marcadas con anticuerpos de superficie y el tetrámero TSKB20/2Kb. La detección intracelular de BrdU fue determinada con *BrdU Flow kit (BD Biosciences)* de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Brevemente, las células se fijaron 30 min con *buffer CytoFix/CytoPerm*, se lavaron con el *buffer Perm/Wash* y se volvieron a fijar por 10 mins con el *buffer Cyto Perm Plus*, siempre a 4°C. Tras otro lavado con el *buffer Perm/Wash*, se incubaron 5 min con el *buffer Cyto Perm Plus* y se volvieron a lavar. Posteriormente se trataron 1 h a 37°C con DNAsa (4 U/mL), se lavaron y se tiñeron con un anticuerpo específico para BrdU conjugado con FITC. Finalmente las células se lavaron y adquirieron en el citómetro de flujo.

## 7. Estudios de viabilidad y apoptosis celular por citometría de flujo

- **Anexina V y 7-amino-actinomicina D (7AAD)**

La apoptosis celular de células T CD8+ se determinó mediante la marcación de las mismas con Anexina V (proteína que une fosfatidilserina, un fosfolípido que se expresa en la membrana externa de células en apoptosis o necrosis) y 7-AAD (compuesto fluorescente que une ADN de células que perdieron la integridad de membrana o necróticas). Células de bazo de ratones WT e IL-17RA KO infectados a distintos días pi fueron incubadas con anticuerpos anti-CD8 y el tetrámero TSKB20/Kb y posteriormente marcadas con Anexina V y 7-AAD siguiendo las especificaciones del fabricante. Las células apoptóticas fueron identificadas como Anexina V+ en la fracción negativa para 7-AAD.

- **Tinción con TMRE: Determinación del potencial de membrana mitocondrial**

EL TMRE es un colorante permeable a la membrana celular que emite fluorescencia en el canal de la ficoeritrina (PE). Por su carga positiva se acumula en mitocondrias activas que tienen una carga relativa negativa, así las mitocondrias de-polarizadas o inactivas poseen un menor potencial de membrana y fallan en secuestrar TMRE. Células de bazo de animales WT e IL-17RA KO a los 10 y 20 días de infección fueron lavadas en buffer HEPES 25mM y teñidas en una solución de TMRE 1nM en buffer HEPES por 30 min a 37°C. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron y adquirieron inmediatamente en el citómetro de flujo. Las

células apoptóticas fueron identificadas como TMRE de baja expresión, una vez excluidas las células necróticas (TMRE-).

#### **8. Determinación por citometría de flujo de la movilización de CD107a a la superficie celular**

Como determinación indirecta de la capacidad citotóxica se realizaron ensayos de degranulación basados en la determinación de la movilización de CD107a a la superficie celular. La molécula CD107a es una proteína intracelular ampliamente expresada en la membrana lisosomal/endosomal y puede expresarse de forma transitoria (ya que se internaliza rápidamente por la vía endocítica) en la superficie de las células T CD8+ y NK luego de que las mismas degranulan. Para determinar la movilización de CD107a a superficie en respuesta al estímulo péptido específico o mitogénico, se realizaron cultivos de forma similar que para determinación de citoquinas intracelulares pero en presencia del anticuerpo anti-CD107a conjugado a un fluorocromo desde el inicio del cultivo. Además, se utilizó monensina y brefeldina A considerando que la monensina además de impedir el transporte vesicular, impide la acidificación de lisosomas y previene entonces la desnaturalización del anticuerpo que pueda haberse internalizado como consecuencia de la endocitosis del CD107a.

### **Ensayos en sobrenadantes de cultivos, suero y lisados celulares**

#### **1. Cuantificación de la actividad de transaminasas hepáticas ALT y AST**

La actividad de transaminasas hepáticas en suero de animales infectados y normales se realizó utilizando el kit Transaminasas 200 (Wiener Lab.), siguiendo instrucciones del fabricante.

#### **2. Cuantificación de citoquinas y quemoquinas por ELISA**

La determinación de citoquinas en sobrenadantes de cultivo o sueros se realizaron con *kits* de ELISA comerciales, según especificaciones del fabricante. Brevemente, placas de 96 pocillos *high binding* fueron sensibilizadas a 4°C durante la noche con 25uL de una dilución del anticuerpo de captura en el *buffer* de sensibilización apropiado para cada analito (buffer carbonato pH 9,6; buffer fosfato pH 9; o PBS pH 7,2). Posteriormente y luego de 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0,01%, las placas fueron bloqueadas con 100uL PBS al 10% de SBF durante 2 h y a temperatura ambiente. Después, se descartó el buffer y 25uL de las muestras (puras o diluidas) y de diluciones seriadas del testigo se incubaron durante toda la noche a 4°C, (). Seguidamente, las placas fueron lavadas e incubadas 2h a temperatura ambiente con 25uL de anticuerpo secundario conjugado a biotina diluido en buffer de bloqueo. Posterior a un nuevo lavado, se agregaron 25uL de estreptoavidina conjugada a peroxidasa y se incubaron 45 min a 25°C. Las placas se lavaron 3 veces

y se incubaron con 40uL del reactivo de color TMB (BD Biosciences), conteniendo el sustrato de la enzima y el cromógeno. Entre 5 y 60 min luego del inicio de la reacción, la misma se inactivó con ácido sulfúrico 2N y se cuantificó la absorbancia a 450nm en un lector de placas.

### **3. Cuantificación de citoquinas y quemoquinas mediante un sistema multiplex por citometría de flujo.**

Para evaluar las citoquinas IL-17A e IL-17F y quemoquinas CXCL-1 y G-CSF se utilizó la metodología multiplex basada en perlas y citometría de flujo, FlowCytomix (eBiosciences) y CBA (BD Biosciences) respectivamente, según especificaciones del fabricante. Esta metodología se basa en el mismo principio que el ELISA (anticuerpo de sensibilización, anticuerpo secundario conjugado a biotina, sistema de detección), pero en vez de realizarse en fase sólida se realiza en base soluble mediante el acoplamiento del inmunoensayos a partículas y la determinación se realiza por citometría de flujo. Brevemente, se utilizan partículas sensibilizadas con el anticuerpo específico para la molécula de interés. Partículas específicas conjugadas con distintos anticuerpos pueden ser utilizadas simultáneamente (multiplex), ya que las mismas pueden ser diferenciadas de acuerdo a características particulares que combinan su tamaño y/o fluorescencia en un determinado canal. Estas partículas son incubadas con la muestra y los estándares de concentración conocida. La interacción entre la partícula sensibilizada y su molécula a determinar es luego evidenciada, mediante el agregado de un anticuerpo secundario conjugado a biotina que es también específico para esa molécula. Finalmente, las muestras y estándares se incuban con estreptoavidina-PE y se adquieren al citómetro de flujo. La intensidad de fluorescencia en el canal PE es directamente proporcional a la concentración de la muestra problema, la cual es determinada en relación a la curva de estándares. Los pasos a seguir van alternando lavados con PBS al 1% de albúmina sérica bovina y varían en duración según tipo de marca del kit comercial. Esta metodología tiene características multiplex, es decir que permite la determinación simultánea de distintos analitos. En este trabajo de tesis se determinaron simultáneamente IL-17A e IL-17F por un lado y CXCL-1 y G-CSF por otro.

### **4. Cuantificación de proteínas**

La concentración de proteínas de los homogenatos tisulares, así como del anticuerpo anti-IFN- $\gamma$  purificado, se determinaron por la técnica de Bradford [246], utilizando el kit *Bio-Rad Protein Assay* Se utilizaron diluciones de albúmina sérica bovina como testigo

## Ensayos de biología molecular

### 1. Extracción de ADN

La extracción de ADN de tejido (bazo, hígado, corazón) se realizó a partir de secciones de órganos que se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento. El ADN total se extrajo empleando reactivo de TRIzol (Life Technologies) según instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras fueron homogeneizadas mecánicamente en 1mL de TRIzol. Posteriormente, se agregaron 0,2mL de cloroformo por cada 1mL de TRIzol, y se conservaron la fase fenol-cloroformo y la interfase conteniendo el ADN. Tras su precipitación con 0,3mL etanol al 100%, el ADN se lavó dos veces con una solución citrato de sodio/etanol (0.1M citrato de sodio en 10% de etanol, pH=8,5) y luego una vez con etanol al 75%. Finalmente se resuspendió en *buffer* Tris-EDTA pH=8. Las concentraciones de ADN se determinaron por espectrofotometría, midiendo absorbancia a 260nm en BIO TEK *microplate spectrophotometer* (BioTek Instruments, Inc.).

### 2. Extracción de ARN

La extracción de ARN de bazo de ratones WT e IL-17RA KO al día 22 pi se realizó a partir de secciones del órgano que se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento. Mientras tanto,  $1 \cdot 10^7$  de células T CD8+ y T CD8- de bazo de los mismos ratones (WT e IL-17RA KO al día 22 pi) fueron purificadas a través de *cell sorting*, resuspendidas en 1mL de TRIzol, y almacenadas a -80 °C hasta su procesamiento. En todos los casos, el ARN total se extrajo empleando reactivo de TRIzol (Life Technologies) según instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras de tejido y las células purificadas fueron homogeneizadas mecánicamente (mediante disgregación con émbolos o pipeteo) en 1mL de TRIzol. Posteriormente, se agregaron 0,2mL de cloroformo por cada 1mL de TRIzol, y se separó la fase acuosa conteniendo el ARN. Tras su precipitación con 0,5mL alcohol isopropílico, el ARN se lavó dos veces con etanol al 75% y se resuspendió en 20uL de agua *ultrapure*. En algunos casos, según se indica, el ARN se obtuvo mediante el uso de *RNAeasy Mini Kit Qiagen* (Crawly, UK), siguiendo instrucciones del fabricante. Las concentraciones de ARN se determinaron por espectrofotometría, midiendo absorbancia a 260nm en BIO TEK *microplate spectrophotometer* o en nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

### 3. Retrotranscripción (RT-PCR)

La síntesis de ADN complementario (ADNc) requerida para la cuantificación por PCR en tiempo real, se realizó utilizando reactivos Promega (EEUU). Brevemente, se preparó en hielo una mezcla de reacción

conteniendo 2ug de ARN total (templado), 0,8ug de *primers* oligo(dT) y agua *ultrapure* hasta un volumen final de 20uL. La mezcla se colocó primero 5 min a 70 °C y luego se enfrió en hielo. Posteriormente, se agregaron 6uL de *buffer* de reacción 5x (250mM Tris-HCl pH=8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub> y 50mM DTT), 30U del inhibidor de ribonucleasas (RNAsas) y 3uL de una muestra de dNTP 10mM; la mezcla se incubó 5 min a 37 °C. Posteriormente se agregaron 60U de la enzima transcriptasa reversa M-MLV RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*), y se incubó durante 1 h a 37 °C. Finalmente la reacción se detuvo calentando a 70 °C por 10 min.

#### 4. PCR en tiempo real

La técnica de PCR en tiempo real se utilizó para cuantificación de ADN de *T. cruzi* y transcritos de IL-17RA. En el primer caso, los cebadores o *primers* de secuencia personalizada (Applied Biosystem) específicos para ADN satélite de *T. cruzi* (GenBank AY520036), fueron diseñados según resultados publicados por Piron y col. [240] y asociados a sondas o *probes* tipo TaqMan. Además, la cantidad de ADN de parásito se relativizó a GAPDH, utilizando *TaqMan Rodent GAPDH control Reagent* de Applied Biosystem. En el segundo caso, se utilizaron sondas *TaqMan Gene Expression Assays* con secuencias prediseñadas: Mm00434214\_m1 para IL-17RA y *Rodent 18S ARNr* como control. En todos los casos las sondas estuvieron conjugadas a FAM (6-carboxifluoresceína) y utilizaron TMRA (tetrametilrodamina) como colorante *quencher*. El secuenciador utilizado en ambos casos fue ABI PRISM 7700 *Sequence Detector* (Perkin-Elmer Applied Biosystem) y el procedimiento respetó las instrucciones del fabricante para ensayos con sondas *probe* tipo TaqMan. El análisis de los resultados se realizó con el software StepOne. Los ciclos umbrales (Ct por sus siglas en inglés, *Cycle threshold*) fueron definidos como el número de ciclos requeridos para alcanzar un umbral de fluorescencia arbitrariamente fijado en etapas donde el logaritmo de la señal se aproximaba a una recta (fase de expansión logarítmica). Se graficó la cantidad relativa del gen *target* según la fórmula  $2^{\delta Ct}$  ajustada a unidades relativas, donde  $\delta Ct$  es la relación entre el Ct del gen *target* y el Ct del gen *housekeeping* o control.

#### 5. Determinación del perfil transcripcional

Células T CD8+ purificadas por *Cell Sorting* de bazo de ratones WT e IL-17RA KO no infectados y al día 22 pi y lisadas con el reactivo de TRIzol. El ARN fue extraído con *RNAeasy Mini Kit* (Qiagen), se cuantificó con Nanodrop 1000 y su calidad fue verificada en Agilent Bioanalyzer. La transcripción reversa se realizó en las condiciones descritas. El experimento de microarreglos de ADN fueron realizados con *GeneChip Mouse Gen 2.1 ST Array* (Affymetrix). La lista de trabajo fue creada con sondas que registraron  $p < 0,05$  para todos los chips, mientras que las sondas superpuestas fueron descartadas. Cada conjunto de datos se corresponde a 3

replicados biológicos independientes de las muestras. Los cambios fueron comparados independientemente para cada muestra. El diagrama de Venn y el análisis de vías de la expresión sólo contemplaron los genes cuyo que cambiaron (incrementaron o disminuyeron) su expresión más de dos veces. Además, los análisis de las vías de expresión fueron mapeados con los accesos del banco de genes o *GenBank* generados, en la base de datos Ingenuity (IPA, <http://www.ingenuity.com>). Los datos completos de los perfiles de expresión analizados están disponibles en la base de datos ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) bajo el número de acceso E-MTAB-2438.

### Estudios histológicos

Hígados obtenidos de ratones WT e IL-17RA KO a distintos tiempos de infección, fueron fijados con formaldehído y embebidos en parafina. Cortes de 5µm de sección realizados con micrótopo fueron teñidos con hematoxilina/eosina según protocolos convencionales y analizados con microscopio NIKON Eclipse TE 2000-U acoplado a cámara de fotos.

### Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 5.0. Según el tipo de comparaciones y el diseño del experimento, se utilizaron los siguientes análisis: *T de Student*, ANOVA de dos vía seguidos del *post-test* de Bonferroni o el test de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *The Lancet* 2010.
2. WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015. 2015.
3. Zabala JP. Historia de la enfermedad de Chagas en Argentina: evolución conceptual, institucional y política. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos* 2009,**16**:57-74.
4. Sanmartino M, Mengascini A, Menegaz A. Miradas Caleidoscópicas sobre el Chagas. Una experiencia educativa en el Museo de La Plata. *Revista Eureka sobre ...* 2012.
5. Sanmartino M, Amieva Nefa SC, Balsalobre A, Carrillo C, Marti G, Medone P, et al. Hablamos de Chagas. Aportes para (re) pensar la problemática desde una mirada integral. 2015.
6. Morin E. *Seven complex lessons in education for the future*: Unesco; 2002.
7. Pinazo MJ, Gascon J. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Trop* 2015.
8. Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009,**104**:31-40.
9. Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica* 2010,**115**:513.
10. Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015,**110**:277-282.
11. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta tropica* 2009,**115**:14-21.
12. Bern C, Montgomery SP. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009,**49**:4.
13. Coura JR, Vinas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 2010,**465**:S6-7.
14. Marin-Neto JA, Rassi A. Actualización sobre la cardiopatía de la enfermedad de Chagas en el primer centenario de su descubrimiento. *Revista Española de Cardiología* 2009,**62**:1211-1216.
15. Rassi A, Joffre Marcondes de R. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America* 2012,**26**:275-291.
16. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet Infectious Diseases* 2013,**13**.
17. Ventura-Garcia L, Roura M, Pell C, Posada E, Gascón J, Aldasoro E, et al. Socio-Cultural Aspects of Chagas Disease: A Systematic Review of Qualitative Research. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2013,**7**.
18. Coura JR. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2013,**108**:962-967.
19. Coura JR, Vinas PA, Junqueira AC. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014,**109**:856-862.
20. Caponi S. Coordenadas epistemológicas de la medicina tropical. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos* 2003,**10**:113-149.
21. WHO. Strategic and technical meeting on intensified control of neglected tropical diseases: a renewed effort to combat entrenched communicable diseases of the poor. 2006.
22. Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009,**104 Suppl 1**:17-30.

23. Barraza OC, Sanmartino M, Vasco JC. Hacia el desarrollo de una cultura científica local para hacer frente a la problemática del Chagas Resultados preliminares de una experiencia con jóvenes de .... *Revista ...* 2012.
24. WHO. Weekly epidemiological record: relevé épidémiologique hebdomadaire. 2015.
25. Spillmann C, Burrone S, Coto H. Análisis de la situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Argentina: Avances en el control, 2012. *Rev. argent. salud publica* 2013.
26. Vazquez-Prokopec GM, Spillmann C, Zaidenberg M, Kitron U, Gürtler RE. Cost-Effectiveness of Chagas Disease Vector Control Strategies in Northwestern Argentina. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2009,**3**.
27. Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, *et al.* A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004,**101**:2034-2039.
28. Bonney KM. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite (Paris, France)* 2014,**21**:11.
29. Fundación-Mundo-Sano, Organización-Panamericana-de-la-Salud. La enfermedad de Chagas: a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral. 2007.
30. Lewinsohn R. Carlos Chagas (1879-1934): the discovery of *Trypanosoma cruzi* and of American trypanosomiasis (foot-notes to the history of Chagas's disease). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979,**73**:513-523.
31. Lewinsohn R. Carlos Chagas and the discovery of Chagas' disease (American trypanosomiasis). *J R Soc Med* 1981,**74**:451-455.
32. Steverding D. The history of Chagas disease. *Parasites & Vectors* 2014,**7**:317.
33. Sanmartino M. 100 años de Chagas (1909-2009): revisión, balance y perspectiva. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 2009.
34. Menghi CI. [Salvador Mazza: a rebel with a cause]. *Rev Argent Microbiol* 2012,**44**:1-2.
35. Cornejo A. [Life and work of Salvador Mazza]. *Sem Med* 1956,**108**:843-856.
36. Leonard J. Research in the Argentine outback: the health quest of Salvador Mazza. *Bull Pan Am Health Organ* 1992,**26**:256-270.
37. Urbina JA. Recent Clinical Trials for the Etiological Treatment of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2015,**62**:149-156.
38. Bustamante J, Tarleton R. Reaching for the Holy Grail: insights from infection/cure models on the prospects for vaccines for *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2015,**110**:445-451.
39. Morilla MJ, Romero EL. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. *Nanomedicine (London, England)* 2015,**10**:465-481.
40. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science (New York, N.Y.)* 2005,**309**:409-415.
41. Clayton J. Chagas disease 101. *Nature* 2010,**465**:S4-5.
42. Carranza JC, Valadares HM, D'Avila DA, Baptista RP, Moreno M, Galvao LM, *et al.* *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *Int J Parasitol* 2009,**39**:963-973.
43. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 2012,**12**:240-253.
44. Messenger LA, Miles MA, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2015,**13**:995-1029.
45. Andrade DV, Gollob KJ, Dutra WO. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2014,**8**.

46. Dutra WO, Menezes CA, Villani FN, da Costa GC, da Silveira AB, Reis D, *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**:208-218.
47. Mitelman JE, Descalzo A, Giménez L, Pesce R. Consenso de Enfermedad de Chagas-Mazza. *Rev Argent ...* 2011.
48. Nunes MC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL, Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of C. Chagas Disease : An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. *Journal of the American College of Cardiology* 2013,**62**.
49. Carod-Artal FJ, Lisak RP, Truong DD, Carroll WM, Bhidayasiri R. International Neurology: A Clinical Approach. *International Neurology: A Clinical Approach* 2010:293-293.
50. Ministerio de Salud de la Nación. Buenos A. Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). 2012.
51. Almeida EA, Lima JN, Lages-Silva E, Guariento ME, Aoki FH, Torres-Morales AE, *et al.* Chagas' disease and HIV co-infection in patients without effective antiretroviral therapy: prevalence, clinical presentation and natural history. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010,**104**:447-452.
52. Teixeira PC. Pathogenesis of Chagas disease cardiomyopathy. *World Journal of Clinical Infectious Diseases* 2012,**2**:39.
53. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 2007,**115**:1109-1123.
54. Carod-Artal FJ. American trypanosomiasis. *Handb Clin Neurol* 2013,**114**:103-123.
55. Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Correa-Oliveira R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet* 1996,**348**:891-892.
56. Bustamante JM, Tarleton RL. Potential new clinical therapies for Chagas disease. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2014,**7**:317-325.
57. Bonney KM, Engman DM. Autoimmune Pathogenesis of Chagas Heart Disease : Looking Back, Looking Ahead. *The American Journal of Pathology* 2015,**185**.
58. Machado FS, Tyler KM, Brant F, Esper L, Teixeira MM, Tanowitz HB. Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 2012,**4**:1743-1758.
59. Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, *et al.* Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis* 2010,**10**:556-570.
60. Pereira PC, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2013,**19**:34.
61. Chatelain E, Konar N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. *Drug Des Devel Ther* 2015,**9**:4807-4823.
62. Medzhitov R, Janeway CA. Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science* 2002,**296**:298-300.
63. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology* 2015,**16**:343-353.
64. Nardy AF, Freire-de-Lima CG, Morrot A. Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology Research* 2015,**2015**.
65. Machado FS, Koyama NS, Carregaro V, Ferreira BR, Milanezi CM, Teixeira MM, *et al.* CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of infectious diseases* 2005,**191**:627-636.
66. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, *et al.* The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2010,**12**.
67. Almeida IC, Gazzinelli R, Ferguson MA, Travassos LR. *Trypanosoma cruzi* mucins: potential functions of a complex structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999,**94 Suppl 1**:173-176.

68. Fernandes MC, Andrews NW. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* : a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiology Reviews* 2012,**36**:734-747.
69. Tarleton R. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Current Opinion in Immunology* 2007,**19**:430-434.
70. Chessler A-DC, Caradonna KL, Da'dara A, Burleigh BA. Type I interferons increase host susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and immunity* 2011,**79**:2112-2119.
71. Silva GK, Costa RS, Silveira TN. Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain Inflammasomes Mediate IL-1 $\beta$  Response and Host Resistance to *Trypanosoma* .... *The Journal of ...* 2013.
72. Rodrigues MM, Oliveira AC, Bellio M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *Journal of Parasitology Research* 2012,**2012**:507874.
73. Pellegrini A, Guiñazu N, Giordanengo L. 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 Medicine* 2011.
74. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, *et al.* Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Seminars in Immunopathology* 2012,**34**:753-770.
75. Filippi CM. Toll-Like Receptor Activation in Immunity vs. Tolerance. *Front Immunol* 2015,**6**:146.
76. Kayama H, Takeda K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect* 2010,**12**:511-517.
77. Hölscher C, Köhler G, Müller U, Mossmann H. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infection and immunity* 1998.
78. Knubel CP, Martinez FF, Fretes RE, Diaz Lujan C, Theumer MG, Cervi L, *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2010,**24**:2689-2701.
79. Gutierrez FR, Mineo TW, Pavanelli WR, Guedes PM, Silva JS. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009,**104**:236-245.
80. Gupta S, Dhiman M, Wen JJ, Garg NJ. ROS signalling of inflammatory cytokines during *Trypanosoma cruzi* infection. *Advances in parasitology* 2011,**76**:153-170.
81. Lieke T, Graefe SEB, Klauenberg U. NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. *Infection and immunity* 2004.
82. Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009,**104**:246-251.
83. Docampo R, Casellas AM, Madeira ED, Cardoni RL, Moreno SN, Mason RP. Oxygen-derived radicals from *Trypanosoma cruzi*-stimulated human neutrophils. *FEBS Lett* 1983,**155**:25-30.
84. Villalta F, Kierszenbaum F. Role of polymorphonuclear cells in Chagas' disease. I. Uptake and mechanisms of destruction of intracellular (amastigote) forms of *Trypanosoma cruzi* by human neutrophils. *J Immunol* 1983,**131**:1504-1510.
85. Aoki MP, Carrera-Silva EA, Cuervo H, Fresno M, Girones N, Gea S. Nonimmune Cells Contribute to Crosstalk between Immune Cells and Inflammatory Mediators in the Innate Response to *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Parasitol Res* 2012,**2012**:737324.
86. Ouaisi A, Guilvard E, Delneste Y. 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**:6366-6374.

87. Bartholomeu DC, Ropert C, Melo MB, Parroche P, Junqueira CF, Teixeira SM, *et al.* Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2008,**181**:1333-1344.
88. Terrazas CA, Huitron E, Vazquez A, Juarez I, Camacho GM, Calleja EA, *et al.* MIF Synergizes with *Trypanosoma cruzi* Antigens to Promote Efficient Dendritic Cell Maturation and IL-12 Production via p38 MAPK. *International Journal of Biological Sciences* 2011,**7**:1298-1310.
89. Brodskyn C, Patricio J, Oliveira R, Lobo L. Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. *Infection and ...* 2002.
90. Poncini CV, Alba Soto CD, Batalla E, Solana ME, Gonzalez Cappa SM. *Trypanosoma cruzi* induces regulatory dendritic cells in vitro. *Infection and immunity* 2008,**76**:2633-2641.
91. Talvani A, Teixeira MM. 8 Inflammation and Chagas Disease: Some Mechanisms and Relevance. *Advances in parasitology* 2011.
92. Luz PR, Velavan TP, Kreamsner PG, Messias-Reason IJ. Association of IP-10 and PDGF-BB levels with clinical forms of chronic Chagas disease. *International Journal of Cardiology* 2013,**169**.
93. Chiribao ML, Libisch G, Parodi-Talice A, Robello C. Early *Trypanosoma cruzi* Infection Reprograms Human Epithelial Cells. *BioMed Research International* 2014,**2014**.
94. Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer PE, Mukherjee S, *et al.* Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cellular microbiology* 2012,**14**:634-643.
95. DosReis GA. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2011,**44**:84-90.
96. Tarleton RL. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Seminars in Immunopathology* 2015,**37**:233238.
97. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001,**357**:1777-1789.
98. Crotty S. A brief history of T cell help to B cells. *Nature Reviews Immunology* 2015.
99. Sepulveda P, Liegeard P, Wallukat G, Levin MJ, Hontebeyrie M. Modulation of cardiocyte functional activity by antibodies against *trypanosoma cruzi* ribosomal P2 protein C terminus. *Infect Immun* 2000,**68**:5114-5119.
100. Boscardin SB, Torrecilhas AC, Manarin R, Revelli S, Rey EG, Tonelli RR, *et al.* Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2010,**14**:1373-1384.
101. Krautz GM, Kissinger JC, Krettli AU. The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 2000,**16**:31-34.
102. Bermejo DA, Amezcua Vesely MC, Khan M, Acosta Rodriguez EV, Montes CL, Merino MC, *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. *Immunology* 2011,**132**:123-133.
103. den Haan JM, Arens R, van Zelm MC. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunol Lett* 2014,**162**:103-112.
104. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations\*. *Annual Review of Immunology* 2010,**28**:445-489.
105. Coquet JM, Rausch L, Borst J. The importance of co-stimulation in the orchestration of T helper cell differentiation. *Immunology and Cell Biology* 2015.
106. Kurtulus S, Tripathi P, Hildeman DA. Protecting and rescuing the effectors: roles of differentiation and survival in the control of memory T cell development. *Frontiers in immunology* 2012,**3**:404.
107. de Meis J, Morrot A, Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DM, Savino W. Differential Regional Immune Response in Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2009,**3**.
108. Cunha-Neto E, Chevillard C, Rodrigues MM, Bozza MT. Immunology and infection by protozoan parasites. *Mediators Inflamm* 2015,**2015**:504951.

109. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986,**136**:2348-2357.
110. Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, *et al.* Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun* 2001,**17**:99-107.
111. Fiuza JA, Fujiwara RT, Gomes JA, Rocha MO, Chaves AT, de Araujo FF, *et al.* Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2009,**3**:e512.
112. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun* 2003,**71**:1185-1193.
113. Holscher C, Mohrs M, Dai WJ, Kohler G, Ryffel B, Schaub GA, *et al.* Tumor Necrosis Factor Alpha-Mediated Toxic Shock in *Trypanosoma cruzi*-Infected Interleukin 10-Deficient Mice. *Infection and Immunity* 2000,**68**:40754083.
114. Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of immunology* 1997.
115. Savino W, Villa-Verde DM, Mendes-da-Cruz DA, Silva-Monteiro E, Perez AR, Aoki Mdel P, *et al.* Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007,**18**:107-124.
116. Bonney KM, Taylor JM, Thorp EB, Epting CL, Engman DM. Depletion of regulatory T cells decreases cardiac parasitosis and inflammation in experimental Chagas disease. *Parasitology Research* 2015,**114**:1167-1178.
117. Kotner J, Tarleton R. Endogenous CD4+ CD25+ regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infection and immunity* 2007.
118. Araújo FFd, Corrêa-Oliveira R, Rocha MOC, Chaves AT, Fiuza JA, Fares RCG, *et al.* Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology* 2012,**217**:768-777.
119. Flores-García Y, Rosales-Encina JL, Rosales-García VH, Satoskar AR, Talamás-Rohana P. Treg Cells Induced by rSSP4 Derived from *T. cruzi* Amastigotes Increase Parasitemia in an Experimental Chagas Disease Model. *BioMed Research International* 2013,**2013**.
120. Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 2011,**35**:161-168.
121. Cox MA, Harrington LE, Zajac AJ. Cytokines and the inception of CD8 T cell responses. *Trends in Immunology* 2011,**32**.
122. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology* 2012,**12**:749-761.
123. Vasconcelos JR, Dominguez MR, Neves RL, Ersching J, Araujo A, Santos LI, *et al.* Adenovirus vector-induced CD8(+) T effector memory cell differentiation and recirculation, but not proliferation, are important for protective immunity against experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *Hum Gene Ther* 2014,**25**:350-363.
124. Cretney E, Xin A, Shi W, Minnich M, Masson F, Miasari M, *et al.* The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat Immunol* 2011,**12**:304-311.
125. Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Claser C, Machado AV, Bruna-Romero O, *et al.* Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. *J Immunol* 2008,**180**:1737-1748.
126. Tzelepis F, de Alencar BC, Penido ML, Gazzinelli RT, Persechini PM, Rodrigues MM. Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. *Infect Immun* 2006,**74**:2477-2481.

127. Padilla AM, Bustamante JM, Tarleton RL. CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. *Curr Opin Immunol* 2009,**21**:385-390.
128. Albareda MC, Olivera GC, Laucella SA, Alvarez MG, Fernandez ER, Lococo B, *et al.* Chronic human infection with Trypanosoma cruzi drives CD4+ T cells to immune senescence. *J Immunol* 2009,**183**:4103-4108.
129. Bustamante JM, Bixby LM, Tarleton RL. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat Med* 2008,**14**:542-550.
130. Vasconcelos JR, Bruna-Romero O, Araujo AF, Dominguez MR, Ersching J, de Alencar BC, *et al.* Pathogen-induced proapoptotic phenotype and high CD95 (Fas) expression accompany a suboptimal CD8+ T-cell response: reversal by adenoviral vaccine. *PLoS Pathog* 2012,**8**:e1002699.
131. Lasso P, Mateus J, Pavia P, Rosas F, Roa N, Thomas MC, *et al.* Inhibitory Receptor Expression on CD8+ T Cells Is Linked to Functional Responses against Trypanosoma cruzi Antigens in Chronic Chagasic Patients. *J Immunol* 2015,**195**:3748-3758.
132. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nature Immunology* 2011,**12**:492-499.
133. Angelosanto JM, Wherry EJ. Transcription factor regulation of CD8+ T-cell memory and exhaustion. *Immunol Rev* 2010,**236**:167-175.
134. Crawford A, Angelosanto JM, Kao C, Doering TA, Odorizzi PM, Barnett BE, *et al.* Molecular and transcriptional basis of CD4(+) T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity* 2014,**40**:289-302.
135. Doering TA, Crawford A, Angelosanto JM, Paley MA, Ziegler CG, Wherry EJ. Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory. *Immunity* 2012,**37**:1130-1144.
136. Schietinger A, Greenberg PD. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol* 2014,**35**:51-60.
137. Sabat R, Witte E, Wolk K, Quesniaux V, Ryffel B, Di Padova F. IL-22 and IL-17: An Overview. *IL-17, IL-22 and Their Producing Cells: Role in Inflammation and Autoimmunity* 2013.
138. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. *Immunology* 2007,**25**:821-852.
139. Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol* 1993,**150**:5445-5456.
140. Li H, Chen J, Huang A, Stinson J, Heldens S, Foster J, *et al.* Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000,**97**:773-778.
141. Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, Lee J, Cai L, Risser P, *et al.* IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J* 2001,**20**:5332-5341.
142. Starnes T, Broxmeyer HE, Robertson MJ, Hromas R. Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. *J Immunol* 2002,**169**:642-646.
143. Lee J, Ho WH, Maruoka M, Corpuz RT, Baldwin DT, Foster JS, *et al.* IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1. *J Biol Chem* 2001,**276**:1660-1664.
144. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members. *Immunity* 2011,**34**.
145. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 Family Members and Inflammation. *Immunity* 2004,**21**.
146. Song X, Qian Y. IL-17 family cytokines mediated signaling in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Cellular Signalling* 2013,**25**.
147. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 2009,**9**:556-567.
148. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nature Reviews Immunology* 2014.

149. Mellett M, Atzei P, Bergin R, Horgan A, Floss T, Wurst W, *et al.* Orphan receptor IL-17RD regulates Toll-like receptor signalling via SEFIR/TIR interactions. *Nature Communications* 2015,**6**.
150. Gor DO, Rose NR, Greenspan NS. TH1-TH2: a procrustean paradigm. *Nat Immunol* 2003,**4**:503-505.
151. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007,**13**:139-145.
152. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Immunology* 2009,**27**:485-517.
153. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. *Immunity* 2006,**24**.
154. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature Immunology* 2007,**8**:345-350.
155. Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* 2013,**64**.
156. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature* 2008,**453**:1051-1057.
157. Lee Y, Kuchroo V. Defining the functional states of Th17 cells. *F1000Research* 2015.
158. Hirota K, Ahlfors H, Duarte JH, Stockinger B. Regulation and function of innate and adaptive interleukin-17-producing cells. *EMBO Rep* 2012,**13**:113-120.
159. Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Ota N, Ouyang W, Hu Y. The IL-17 Family Cytokines in Immunity and Disease. *Journal of Clinical Immunology* 2010,**30**:185-195.
160. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature reviews. Immunology* 2010,**10**:479-489.
161. Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *Journal of autoimmunity* 2015,**60**:1-11.
162. Song L, Jianan R, Jieshou L. IL-17RA in Intestinal Inflammation: Structure, Signaling, Function, and Clinical Application. *Inflammatory Bowel Diseases* 2015,**21**:154.
163. Hsu HC, Yang P, Wang J, Wu Q, Myers R, Chen J, *et al.* Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol* 2008,**9**:166-175.
164. Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, *et al.* Differential Roles of Interleukin-17A and -17F in Host Defense against Mucoepithelial Bacterial Infection and Allergic Responses. *Immunity* 2008,**30**.
165. O'Connor W, Jr., Kamanaka M, Booth CJ, Town T, Nakae S, Iwakura Y, *et al.* A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* 2009,**10**:603-609.
166. Wu L, Zepp J, Li X. Function of Act1 in IL-17 family signaling and autoimmunity. *Adv Exp Med Biol* 2012,**946**:223-235.
167. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008,**28**:454-467.
168. Bar E, Whitney PG, Moor K, Reis e Sousa C, LeibundGut-Landmann S. IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK cells. *Immunity* 2014,**40**:117-127.
169. Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol* 2010,**7**:164-174.
170. Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z, *et al.* Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J Immunol* 2000,**164**:4783-4789.
171. Schwarzenberger P, La Russa V, Miller A, Ye P, Huang W, Zieske A, *et al.* IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. *J Immunol* 1998,**161**:6383-6389.
172. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, *et al.* Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 2001,**194**:519-527.

173. Witowski J, Pawlaczyk K, Breborowicz A, Scheuren A, Kuzlan-Pawlaczyk M, Wisniewska J, *et al.* IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells. *J Immunol* 2000,**165**:5814-5821.
174. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 2005,**22**:285-294.
175. Ley K, Smith E, Stark MA. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunologic Research* 2006,**34**:229-242.
176. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2013,**13**:159-175.
177. Jaillon S, Galdiero MR, Del Prete D, Cassatella MA, Garlanda C, Mantovani A. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Seminars in immunopathology* 2013,**35**:377-394.
178. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nature Immunology* 2014,**15**:602-611.
179. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 2011,**11**:519-531.
180. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression. *Frontiers in Immunology* 2014,**5**.
181. Ryu H, Chung Y. Regulation of IL-17 in atherosclerosis and related autoimmunity. *Cytokine* 2015,**74**:219227.
182. Xie S, Li J, Wang JH, Wu Q, Yang P, Hsu HC, *et al.* IL-17 activates the canonical NF-kappaB signaling pathway in autoimmune B cells of BXD2 mice to upregulate the expression of regulators of G-protein signaling 16. *J Immunol* 2010,**184**:2289-2296.
183. Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, *et al.* Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* 2009,**10**:778-785.
184. Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, *et al.* IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2007.
185. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, *et al.* IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nature Immunology* 2007,**8**:369-377.
186. Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, Yang XO, Yamazaki T, Lu S, *et al.* T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 2009,**31**:787-798.
187. Xu S, Han Y, Xu X, Bao Y, Zhang M, Cao X. IL-17A-producing gammadeltaT cells promote CTL responses against Listeria monocytogenes infection by enhancing dendritic cell cross-presentation. *J Immunol* 2010,**185**:5879-5887.
188. Sonnenberg GF, Nair MG, Kirn TJ, Zaph C, Fouser LA, Artis D. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med* 2010,**207**:1293-1305.
189. Andoh A, Fujino S, Bamba S, Araki Y, Okuno T, Bamba T, *et al.* IL-17 selectively down-regulates TNF-alpha-induced RANTES gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *J Immunol* 2002,**169**:1683-1687.
190. Kanda N, Koike S, Watanabe S. IL-17 suppresses TNF-alpha-induced CCL27 production through induction of COX-2 in human keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2005,**116**:1144-1150.
191. Schnyder B, Schnyder-Candrian S, Pansky A, Schmitz ML, Heim M, Ryffel B, *et al.* IL-17 reduces TNF-induced Rantes and VCAM-1 expression. *Cytokine* 2005,**31**:191-202.
192. Ogawa A, Andoh A, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Immunol* 2004,**110**:55-62.
193. Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, *et al.* Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med* 2006,**203**:2715-2725.

194. Suryawanshi A, Cao Z, Sampson JF, Panjwani N. IL-17A-mediated protection against *Acanthamoeba* keratitis. *J Immunol* 2015,**194**:650-663.
195. Gosmann C, Mattarollo SR, Bridge JA, Frazer IH, Blumenthal A. IL-17 Suppresses Immune Effector Functions in Human Papillomavirus-Associated Epithelial Hyperplasia. *The Journal of Immunology* 2014,**193**:2248-2257.
196. Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, Acero L, *et al.* Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med* 2008,**205**:1063-1075.
197. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging Microbes & Infections* 2013,**2**.
198. Wang YH, Angkasekwina P, Lu N, Voo KS, Arima K, Hanabuchi S, *et al.* IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med* 2007,**204**:1837-1847.
199. Valizadeh A, Khosravi A, Zadeh LJ, Parizad EG. Role of IL-25 in Immunity. *J Clin Diagn Res* 2015,**9**:OE01-04.
200. Swaidani S, Bulek K, Kang Z, Gulen MF, Liu C, Yin W, *et al.* T cell-derived Act1 is necessary for IL-25-mediated Th2 responses and allergic airway inflammation. *J Immunol* 2011,**187**:3155-3164.
201. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, *et al.* IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001,**15**:985-995.
202. Renaud JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 2001,**54**:577-589.
203. Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, Gilbert JM, Clifford T, Kwan S, *et al.* New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol* 2002,**169**:443-453.
204. Letuve S, Lajoie-Kadoch S, Audusseau S, Rothenberg ME, Fiset PO, Ludwig MS, *et al.* IL-17E upregulates the expression of proinflammatory cytokines in lung fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 2006,**117**:590-596.
205. Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol* 2002,**3**:715-720.
206. Song X, Zhu S, Shi P, Liu Y, Shi Y, Levin SD, *et al.* IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens. *Nat Immunol* 2011,**12**:1151-1158.
207. Johnston A, Fritz Y, Dawes SM, Diaconu D, Al-Attar PM, Guzman AM, *et al.* Keratinocyte overexpression of IL-17C promotes psoriasiform skin inflammation. *J Immunol* 2013,**190**:2252-2262.
208. Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A, Luis E, Lin Z, Jeet S, Lesch J, *et al.* IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nat Immunol* 2011,**12**:1159-1166.
209. Chang SH, Reynolds JM, Pappu BP, Chen G, Martinez GJ, Dong C. Interleukin-17C promotes Th17 cell responses and autoimmune disease via interleukin-17 receptor E. *Immunity* 2011,**35**:611-621.
210. Furuta S, Jeng YM, Zhou L, Huang L, Kuhn I, Bissell MJ, *et al.* IL-25 causes apoptosis of IL-25R-expressing breast cancer cells without toxicity to nonmalignant cells. *Sci Transl Med* 2011,**3**:78ra31.
211. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 2010,**129**:311-321.
212. Puel A, Cypowyj S, Marodi L, Abel L, Picard C, Casanova JL. Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012,**12**:616-622.
213. Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, *et al.* Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 2011,**332**:65-68.
214. Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol* 2007,**51**:1139-1147.
215. Curtis MM, Way SS. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 2009,**126**:177-185.
216. Khader SA, Gopal R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. *Virulence* 2010,**1**:423-427.

217. Happel KI, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, *et al.* Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol* 2003,**170**:4432-4436.
218. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, *et al.* IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 2008,**14**:275-281.
219. Yoichiro I, Susumu N, Shinobu S, Harumichi I. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunological Reviews* 2008,**226**:57-79.
220. Collins JW, Keeney KM, Crepin VF, Rathinam VA, Fitzgerald KA, Finlay BB, *et al.* *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2014,**12**:612-623.
221. Cho JS, Pietras EM, Garcia NC, Ramos RI, Farzam DM, Monroe HR, *et al.* IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J Clin Invest* 2010,**120**:1762-1773.
222. Yu JJ, Ruddy MJ, Conti HR, Boonananantanasarn K, Gaffen SL. The interleukin-17 receptor plays a gender-dependent role in host protection against *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontal bone loss. *Infect Immun* 2008,**76**:4206-4213.
223. Kabir S. The role of interleukin-17 in the *Helicobacter pylori* induced infection and immunity. *Helicobacter* 2011,**16**:1-8.
224. Lin Y, Ritchea S, Logar A, Slight S, Messmer M, Rangel-Moreno J, *et al.* Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity* 2009,**31**:799-810.
225. Scurlock AM, Frazer LC, Andrews CW, Jr., O'Connell CM, Foote IP, Bailey SL, *et al.* Interleukin-17 contributes to generation of Th1 immunity and neutrophil recruitment during *Chlamydia muridarum* genital tract infection but is not required for macrophage influx or normal resolution of infection. *Infect Immun* 2011,**79**:1349-1362.
226. Hamada S, Umemura M, Shiono T, Tanaka K, Yahagi A, Begum MD, *et al.* IL-17A produced by  $\gamma\delta$  T cells plays a critical role in innate immunity against *Listeria monocytogenes* infection in the liver. *J Immunol* 2008,**181**:3456-3463.
227. Meeks KD, Sieve AN, Kolls JK, Ghilardi N, Berg RE. IL-23 is required for protection against systemic infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 2009,**183**:8026-8034.
228. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997,**41**:563-569.
229. Cypowyj S, Picard C, Marodi L, Casanova JL, Puel A. Immunity to infection in IL-17-deficient mice and humans. *Eur J Immunol* 2012,**42**:2246-2254.
230. Huppler AR, Bishu S, Gaffen SL. Mucocutaneous candidiasis: the IL-17 pathway and implications for targeted immunotherapy. *Arthritis Res Ther* 2012,**14**:217.
231. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, *et al.* Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 1995,**3**:811-821.
232. Kohyama S, Ohno S, Isoda A, Moriya O, Belladonna ML, Hayashi H, *et al.* IL-23 enhances host defense against vaccinia virus infection via a mechanism partly involving IL-17. *J Immunol* 2007,**179**:3917-3925.
233. Crowe CR, Chen K, Pociask DA, Alcorn JF, Krivich C, Enelow RI, *et al.* Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *J Immunol* 2009,**183**:5301-5310.
234. Petersen BC, Dolgachev V, Rasky A, Lukacs NW. IL-17E (IL-25) and IL-17RB promote respiratory syncytial virus-induced pulmonary disease. *J Leukoc Biol* 2014.
235. Hirohata S, Shibuya H, Tejima S. Suppressing influences of IFN- $\alpha$  on IL-17 expression in human CD4<sup>+</sup> T cells. *Clin Immunol* 2010,**134**:340-344.
236. Kelly MN, Kolls JK, Happel K, Schwartzman JD, Schwarzenberger P, Combe C, *et al.* Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* 2005,**73**:617-621.

237. Guiton R, Vasseur V, Charron S, Arias MT, Van Langendonck N, Buzoni-Gatel D, *et al.* Interleukin 17 receptor signaling is deleterious during *Toxoplasma gondii* infection in susceptible BL6 mice. *J Infect Dis* 2010,**202**:427-435.
238. da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, *et al.* IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS neglected tropical diseases* 2010,**4**.
239. Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimanoe Y, Iwakura Y, Yoshida H. IL-17 Is Necessary for Host Protection against Acute-Phase *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Immunology* 2010,**185**:1150-1157.
240. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, Lopez-Chejade P, Puig L, Verges M, *et al.* Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop* 2007,**103**:195-200.
241. Yi T, Zhao D, Lin CL, Zhang C, Chen Y, Todorov I, *et al.* Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood* 2008,**112**:2101-2110.
242. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007,**7**:678-689.
243. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 2005,**6**:1182-1190.
244. Andrade ZA. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999,**94 Suppl 1**:71-80.
245. Bendall LJ, Bradstock KF. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014,**25**:355-367.
246. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976,**72**:248-254.
247. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, *et al.* T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996,**183**:2593-2603.
248. Sun D, Novotny M, Bulek K, Liu C, Li X, Hamilton T. Treatment with IL-17 prolongs the half-life of chemokine CXCL1 mRNA via the adaptor TRAF5 and the splicing-regulatory factor SF2 (ASF). *Nat Immunol* 2011,**12**:853-860.
249. Luster AD, Ravetch JV. Genomic characterization of a gamma-interferon-inducible gene (IP-10) and identification of an interferon-inducible hypersensitive site. *Mol Cell Biol* 1987,**7**:3723-3731.
250. Zhang X, Majlessi L, Deriaud E, Leclerc C, Lo-Man R. Coactivation of Syk Kinase and MyD88 Adaptor Protein Pathways by Bacteria Promotes Regulatory Properties of Neutrophils. *Immunity* 2009,**31**.
251. De Santo C, Arscott R, Booth S, Karydis I, Jones M, Asher R, *et al.* Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat Immunol* 2010,**11**:1039-1046.
252. Low HP, Santos MA, Wizel B, Tarleton RL. Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8+ CTL. *J Immunol* 1998,**160**:1817-1823.
253. Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT, Sullivan S, *et al.* CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. *PLoS Pathog* 2006,**2**:e77.
254. Doherty PC, Christensen JP. Accessing complexity: the dynamics of virus-specific T cell responses. *Annu Rev Immunol* 2000,**18**:561-592.
255. Harty JT, Badovinac VP. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol* 2008,**8**:107-119.
256. Novy P, Huang X, Leonard WJ, Yang Y. Intrinsic IL-21 signaling is critical for CD8 T cell survival and memory formation in response to vaccinia viral infection. *J Immunol* 2011,**186**:2729-2738.
257. Yi JS, Ingram JT, Zajac AJ. IL-21 deficiency influences CD8 T cell quality and recall responses following an acute viral infection. *J Immunol* 2010,**185**:4835-4845.
258. Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, *et al.* Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity* 2007,**27**:281-295.

259. Pearce EL, Shen H. Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12. *J Immunol* 2007,**179**:2074-2081.
260. Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol* 2004,**5**:809-817.
261. Badovinac VP, Harty JT. Manipulating the rate of memory CD8+ T cell generation after acute infection. *J Immunol* 2007,**179**:53-63.
262. Kalia V, Sarkar S, Ahmed R. CD8 T-cell memory differentiation during acute and chronic viral infections. *Adv Exp Med Biol* 2010,**684**:79-95.
263. Pipkin ME, Sacks JA, Cruz-Guilloty F, Lichtenheld MG, Bevan MJ, Rao A. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* 2010,**32**:79-90.
264. Bixby LM, Tarleton RL. Stable CD8+ T cell memory during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 2008,**181**:2644-2650.
265. Shannon MK, Wherry EJ, Allan JZ. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology* 2015.
266. Grusdat M, McIlwain DR, Xu HC, Pozdeev VI, Knievel J, Crome SQ, *et al.* IRF4 and BATF are critical for CD8(+) T-cell function following infection with LCMV. *Cell Death Differ* 2014,**21**:1050-1060.
267. Kurachi M, Barnitz RA, Yosef N, Odorizzi PM, Dilorio MA, Lemieux ME, *et al.* The transcription factor BATF operates as an essential differentiation checkpoint in early effector CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2014,**15**:373-383.
268. Yao S, Buzo BF, Pham D, Jiang L, Taparowsky EJ, Kaplan MH, *et al.* Interferon regulatory factor 4 sustains CD8(+) T cell expansion and effector differentiation. *Immunity* 2013,**39**:833-845.
269. Quigley M, Pereyra F, Nilsson B, Porichis F, Fonseca C, Eichbaum Q, *et al.* Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med* 2010,**16**:1147-1151.
270. Dutra WO, Menezes CAS, Magalhães LMD, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunology* 2014,**36**:377-387.
271. Owyang AM, Zaph C, Wilson EH, Guild KJ, McClanahan T, Miller HR, *et al.* Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2006,**203**:843-849.
272. Bermejo DA, Jackson SW, Gorosito-Serran M, Acosta-Rodriguez EV, Amezcua-Vesely MC, Sather BD, *et al.* *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors RORgammat and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nat Immunol* 2013,**14**:514-522.
273. Luisa MDM, Fernanda NAV, Maria do Carmo PN, Kenneth JG, Manoel OCR, Walderez OD. High Interleukin 17 Expression Is Correlated With Better Cardiac Function in Human Chagas Disease. *Journal of Infectious Diseases* 2013,**207**:661-665.
274. O'Connor WJ, Zenewicz LA, Flavell RA. The dual nature of TH17 cells: shifting the focus to function. *Nature Immunology* 2010,**11**:471-476.
275. Monteleone G, Pallone F, Macdonald TT. Interleukin-25: a two-edged sword in the control of immune-inflammatory responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010,**21**:471-475.
276. Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol* 2011,**32**:452-460.
277. Muller I, Munder M, Kropf P, Hansch GM. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol* 2009,**30**:522-530.
278. Poe SL, Arora M, Oriss TB, Yarlagadda M, Isse K, Khare A, *et al.* STAT1-regulated lung MDSC-like cells produce IL-10 and efferocytose apoptotic neutrophils with relevance in resolution of bacterial pneumonia. *Mucosal Immunology* 2012,**6**:189-199.

279. Chen L, Watanabe T, Watanabe H, Sendo F. Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB / c, but protects C57BL / 6 mice through modulating the Th1 / Th2 dichotomy in different directions. *European Journal of Immunology* 2001,**31**:265-275.
280. Joos C, Marrama L, Polson HE, Corre S, Diatta AM, Diouf B, *et al.* Clinical protection from falciparum malaria correlates with neutrophil respiratory bursts induced by merozoites opsonized with human serum antibodies. *PLoS One* 2010,**5**:e9871.
281. Luna-Gomes T, Filardy AA, Rocha JD, Decote-Ricardo D, LaRocque-de-Freitas IF, Morrot A, *et al.* Neutrophils Increase or Reduce Parasite Burden in Trypanosoma cruzi-Infected Macrophages, Depending on Host Strain: Role of Neutrophil Elastase. *PLoS ONE* 2014,**9**.
282. Mitsdoerffer M, Lee Y, Jager A, Kim HJ, Korn T, Kolls JK, *et al.* Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010,**107**:14292-14297.
283. Sales PA, Jr., Golgher D, Oliveira RV, Vieira V, Arantes RM, Lannes-Vieira J, *et al.* The regulatory CD4+CD25+ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with Trypanosoma cruzi. *Microbes Infect* 2008,**10**:680-688.
284. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009,**9**:162-174.
285. Bouabe H, Liu Y, Moser M, Bosl MR, Heesemann J. Novel highly sensitive IL-10-beta-lactamase reporter mouse reveals cells of the innate immune system as a substantial source of IL-10 in vivo. *J Immunol* 2011,**187**:3165-3176.
286. Arocena AR, Onofrio LI, Pellegrini AV, Carrera Silva AE, Paroli A, Cano RC, *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**:184-194.
287. Ferreira LR, Silva AM, Michailowsky V, Reis LF, Gazzinelli RT. Expression of serum amyloid A3 mRNA by inflammatory macrophages exposed to membrane glycoconjugates from Trypanosoma cruzi. *J Leukoc Biol* 1999,**66**:593-600.
288. Davey MS, Tamassia N, Rossato M, Bazzoni F, Calzetti F, Bruderek K, *et al.* Failure to detect production of IL-10 by activated human neutrophils. *Nat Immunol* 2011,**12**:1017-1018; author reply 1018-1020.
289. Tamassia N, Zimmermann M, Castellucci M, Ostuni R, Bruderek K, Schilling B, *et al.* Cutting edge: An inactive chromatin configuration at the IL-10 locus in human neutrophils. *J Immunol* 2013,**190**:1921-1925.
290. Lewkowicz N, Mycko MP, Przygodzka P, Cwiklinska H, Cichalewska M, Matysiak M, *et al.* Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10. *Mucosal Immunol* 2015.
291. Balderramas HA, Penitenti M, Rodrigues DR, Bachiega TF, Fernandes RK, Ikoma MR, *et al.* Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to Paracoccidioides brasiliensis. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1. *Cytokine* 2014,**67**:36-43.
292. Zhang L, Tarleton RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis* 1999,**180**:480-486.
293. Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in chagas disease--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006,**101**:463-491.
294. Freitas A, Alves-Filho JC, Victoni T, Secher T, Lemos HP, Sonogo F, *et al.* IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis. *J Immunol* 2009,**182**:7846-7854.
295. Waters WR, Palmer MV, Whipple DL, Slaughter RE, Jones SL. Immune responses of white-tailed deer (Odocoileus virginianus) to Mycobacterium bovis BCG vaccination. *J Wildl Dis* 2004,**40**:66-78.
296. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 2003,**77**:4911-4927.
297. Zeng R, Spolski R, Finkelstein SE, Oh S, Kovanen PE, Hinrichs CS, *et al.* Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J Exp Med* 2005,**201**:139-148.

298. Lindemann MJ, Hu Z, Benczik M, Liu KD, Gaffen SL. Differential regulation of the IL-17 receptor by gammac cytokines: inhibitory signaling by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2008,**283**:14100-14108.
299. Maitra A, Shen F, Hanel W, Mossman K, Tocker J, Swart D, *et al.* Distinct functional motifs within the IL-17 receptor regulate signal transduction and target gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007,**104**:7506-7511.
300. Shen F, Hu Z, Goswami J, Gaffen SL. Identification of common transcriptional regulatory elements in interleukin-17 target genes. *J Biol Chem* 2006,**281**:24138-24148.
301. Pappu R, Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A. The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases. *Immunology* 2011,**134**:8-16.
302. Gigley JP, Bhadra R, Moretto MM, Khan IA. T cell exhaustion in protozoan disease. *Trends in parasitology* 2012,**28**:377-384.
303. Tzelepis F, Persechini PM, Rodrigues MM. Modulation of CD4(+) T cell-dependent specific cytotoxic CD8(+) T cells differentiation and proliferation by the timing of increase in the pathogen load. *PLoS One* 2007,**2**:e393.
304. Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, *et al.* Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity* 2007,**27**.
305. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, *et al.* IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007,**448**:484-487.
306. Best JA, Blair DA, Knell J, Yang E, Mayya V, Doedens A, *et al.* Transcriptional insights into the CD8(+) T cell response to infection and memory T cell formation. *Nat Immunol* 2013,**14**:404-412.
307. Hu G, Chen J. A genome-wide regulatory network identifies key transcription factors for memory CD8(+) T-cell development. *Nat Commun* 2013,**4**:2830.
308. Rutishauser RL, Martins GA, Kalachikov S, Chandele A, Parish IA, Meffre E, *et al.* Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity* 2009,**31**:296-308.
309. Kuroda S, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Takayanagi H, Iwai Y. Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like (BATF) regulates epigenetically and energetically effector CD8 T-cell differentiation via Sirt1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011,**108**:14885-14889.
310. Man K, Miasari M, Shi W, Xin A, Henstridge DC, Preston S, *et al.* The transcription factor IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nat Immunol* 2013,**14**:1155-1165.
311. Raczkowski F, Ritter J, Heesch K, Schumacher V, Guralnik A, Hocker L, *et al.* The transcription factor Interferon Regulatory Factor 4 is required for the generation of protective effector CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013,**110**:15019-15024.
312. Kwon H, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Kim HP, Oh J, Tunyaplin C, *et al.* Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors. *Immunity* 2009,**31**:941-952.
313. Li P, Spolski R, Liao W, Wang L, Murphy TL, Murphy KM, *et al.* BATF-JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells. *Nature* 2012,**490**:543-546.
314. Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, *et al.* A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* 2012,**151**:289-303.
315. Tussiwand R, Lee WL, Murphy TL, Mashayekhi M, Kc W, Albring JC, *et al.* Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature* 2012,**490**:502-507.
316. Albareda MC, Laucella SA, Alvarez MG, Armenti AH, Bertochi G, Tarleton RL, *et al.* Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol* 2006,**18**:465-471.

317. Haas JD, Ravens S, Duber S, Sandrock I, Oberdorfer L, Kashani E, *et al.* Development of interleukin-17-producing gammadelta T cells is restricted to a functional embryonic wave. *Immunity* 2012,**37**:48-59.
318. Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 2008,**83**:64-70.
319. Souza DG, Cara DC, Cassali GD, Coutinho SF, Silveira MR, Andrade SP, *et al.* Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. *Br J Pharmacol* 2000,**131**:1800-1808.