

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL INFILTRADO INFLAMATORIO DE
CORAZONES CON CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA**

FREDY ALEXANDER DELGADO MORALES

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SAUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2018**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL INFILTRADO INFLAMATORIO DE
CORAZONES CON CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA**

FREDY ALEXANDER DELGADO MORALES

Trabajo de grado presentado para optar al título de:

MAESTRO EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

DIRECTOR

CLARA ISABEL GONZÁLEZ RUGELES

MSc en Microbiología, PhD Ciencias Biológicas

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2018

ADECIMIENTOS

A la vida, por abrir caminos y guiar mis pasos.

A todo el personal del Giem, especialmente a la Dra. Clara Isabel por ser mi mentora en esta etapa de crecimiento profesional y personal. A Ángela, por todas las traspasadas y su ayuda desinteresada.

A la Doctora Wendy y al Doctor Pedro Forero por sus enseñanzas y apoyo.

A mis padres Sergio y Gloria y a mi hermana, por ser los ejes fundamentales en mi desarrollo, por su apoyo, comprensión y motivación en todo momento.

A mis amigos de vida especialmente a Erika, Laurita y Jenny por estar siempre en el momento justo con las palabras necesarias.

A todas aquellas personas, amigos y familiares que de una u otra forma hicieron parte en este proceso de formación.

A los que se fueron pero siguen en nuestros corazones y en nuestras mentes, sé que este logro también les alegra estén donde estén!

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. ENFERMEDAD DE CHAGAS	15
1.1. EPIDEMIOLOGÍA	15
1.2. EL PARÁSITO	17
1.2.1. Ciclo de vida	18
1.2.2. Vías de transmisión	19
1.2.2.1. Transmisión vectorial	19
1.2.2.2. Transfusión de sangre y trasplante de órganos	20
1.2.2.3. Transmisión vertical	20
1.2.2.4. Transmisión oral	21
1.2.2.5. Transmisión accidental	21
1.3. ESTADIOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD	21
1.3.1. Fase aguda	21
1.3.2. Fase crónica indeterminada	22
1.3.3. Fase crónica sintomática	22
1.3.3.1. Forma cardiaca	22
1.3.3.2. Forma digestiva	23
1.3.3.3. Forma cardiodigestiva	24
1.4. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD	24
1.5. TRATAMIENTO	25
1.5.1. Tratamiento de los síntomas cardiacos	26
1.6. PATOGÉNESIS DE LA ECh	26
1.6.1. Disautonomía cardiaca	26
1.6.2. Alteraciones microvasculares	27
1.6.3. Daño miocárdico relacionado con la persistencia crónica del parásito	27
1.6.4. Mecanismo inmunológico	28

1.7. RESPUESTA INMUNE EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	29
1.7.1. Respuesta inmune innata	29
1.7.2. Inmunidad adquirida	31
1.7.3. Inducción de la respuesta de células T	32
1.7.4. Papel de los linfocitos T en el control de la infección	33
1.7.5. Células T reguladoras	34
1.7.6. Linfocitos B y producción de anticuerpos	34
1.7.7. Papel de la respuesta inmune en el desarrollo de la CCC	35
1.8. CARDIOPATÍA DILATADA	36
1.8.1. Cardiomiopatía chagásica crónica	37
1.8.2. Cardiomiopatía dilatada idiopática	38
1.8.3. CCC vs CDI	39
2. JUSTIFICACIÓN	40
3. OBJETIVOS	42
3.1. Objetivo general	42
3.2. Objetivos específicos	42
4. MATERIALES Y MÉTODOS	43
4.1. Población de estudio	43
4.2. Marcadores	43
4.3. Obtención de las muestras	44
4.3.1. Células mononucleares del infiltrado inflamatorio	45
4.4. Evaluación fenotípica	46
4.4.1. Evaluación del marcador intracelular FoxP3 por citometría de flujo	46
4.5. Análisis histológico	48
4.6. Análisis de las muestras	48

4.7. Método estadístico	48
4.8. Aspectos éticos	49
5. RESULTADOS	51
5.1. Análisis de la población de estudio	51
5.2. Caracterización fenotípica del infiltrado inflamatorio en pacientes con ECh	51
5.3. Caracterización fenotípica del infiltrado inflamatorio en pacientes con CDI	54
5.4. Infiltrado inflamatorio en sujetos sanos	56
5.5. Fenotipo celular CCC vs CDI	56
5.6. Análisis histopatológico	57
6. DISCUSIÓN	58
7. CONCLUSIÓN	67
8. RECOMENDACIONES	68
BIBLIOGRAFIA	69

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. TLRs implicados en el reconocimiento de PAMPs derivados de <i>T. cruzi</i> .	30
Tabla 2. Marcadores utilizados para determinar el fenotipo celular, función y expresión celular.	43
Tabla 3. Anticuerpos utilizados en los diferentes paneles de caracterización fenotípica.	46
Tabla 4. Paneles para la caracterización fenotípica de las células mediante citometría de flujo.	48
Tabla 5. Descripción de los sujetos de estudio.	51
Tabla 6. Caracterización fenotípica del infiltrado en explantes de pacientes con ECh.	54
Tabla 7. Caracterización fenotípica del infiltrado en explantes de pacientes con CDI.	55

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Número estimado de inmigrantes con infección por <i>T. cruzi</i> viviendo en países no endémicos	16
Figura 2. Estadios de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
Figura 4. Desarrollo de la respuesta inmune innata en la infección por <i>T. cruzi</i>	31
Figura 5. Estrategias de selección para la identificación de poblaciones celulares	53
Figura 6. Infiltrado inflamatorio de corazones con CCC vs CDI	56
Figura 7. Histopatología de la pared posterior del ventrículo izquierdo de explantes cardíacos con CCC (A), CDI (B) y controles (C).	57

RESUMEN

TÍTULO: CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL INFILTRADO INFLAMATORIO DE CORAZONES CON CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA*

AUTORES: DELGADO MORALES Fredy Alexander ** GONZÁLEZ RUGELES Clara Isabel.

PALABRAS CLAVES: Cardiomiopatía chagásica crónica, cardiomiopatía dilatada.

DESCRIPCIÓN

La enfermedad de Chagas representa un grave problema de salud pública y se estima que cerca de 8 millones de personas padecen la enfermedad en el mundo. Los factores implicados en la patogénesis no están bien esclarecidos, sin embargo se ha establecido que la respuesta inmune del hospedero es determinante en su desarrollo. Se realizó la caracterización fenotípica del infiltrado inflamatorio de corazones de pacientes diagnosticados con CCC (n=4), CID (n=5) e individuos sanos (n=7).

El infiltrado de corazones con CCC mostró predominancia de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo de memoria y menor proporción de células T con fenotipo cooperador ($p=0.003$). El 2% de las células infiltrantes fueron linfocitos B y 13,8% monocitos. Con relación a los explantes de sujetos con CID, el promedio de células CD4⁺ fue menor en los pacientes con CCC ($p=0,0003$), mientras que la media de células CD8⁺ fue superior en este grupo ($p=0,0005$). La población de linfocitos T cooperadores de memoria (CD4⁺CD45RO⁺) fue mayor en el infiltrado de pacientes con ECh ($p=0,02$), mientras que el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ con expresión doble positiva de los marcadores CD45RA⁺CD45RO⁺ fue menor ($p=0,02$). Por otra parte la media de los linfocitos T citotóxicos de memoria (CD8⁺CD45RO⁺) fue superior ($p=0,009$) y hubo menor porcentaje de población de linfocitos T CD8⁺ doble positiva CD45RA⁺CD45RO⁺ en pacientes con ECh ($p=0,005$). No se observaron diferencias significativas para las demás poblaciones celulares analizadas.

Estos datos demuestran la presencia de una miocarditis activa consecuencia de la infección persistente en baja dosis del parásito en pacientes con CCC. Esta miocarditis se caracteriza por la presencia de células proinflamatorias con perfil Th1 que favorecen el daño al tejido cardíaco y contribuyen al mantenimiento de la falla cardíaca. La persistencia de antígenos del parásito durante décadas probablemente afecte la respuesta inmune conduciendo al deterioro de la respuesta de células T.

*Trabajo de grado

**Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Directora de trabajo de grado Clara Isabel González Rugeles. *MSc en Microbiología, PhD Ciencias Biológicas.*

ABSTRACT

TÍTULO: PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF THE INFLAMMATORY INFILTRATE OF HEARTS WITH CHRONIC CHAGASIC CARDIOMYOPATHY*

AUTHORS: DELGADO MORALES Fredy Alexander ** GONZÁLEZ RUGELES Clara Isabel.

KEY WORDS: Chronic Chagasic cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy, lymphocytes

DESCRIPTION

Chagas disease is a serious public health problem and it is estimated that about 8 million people suffer from the disease in the world. The factors involved in the pathogenesis are not well understood, however it has been established that the immune response of the host is determinant in its development. We performed the phenotypic characterization of the inflammatory infiltrate of hearts from patients diagnosed with CCC (n = 4), ICD (n = 5) and healthy individuals (n = 7).

Heart infiltration with CCC showed predominance of CD8⁺ T lymphocytes with memory phenotype and lower proportion of T cells with cooperating phenotype ($p = 0.003$). We found that 2% of the infiltrating cells were B lymphocytes and 13.8% monocytes. Regarding the explants of subjects with CID, the mean number of CD4⁺ cells was lower in patients with CCC ($p = 0.0003$), while mean CD8⁺ cells were higher in this group ($p = 0.0005$). The CD4⁺ CD45RO⁺ population was higher in the infiltrate of patients with ECh ($p = 0.02$), while the CD4⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁺ percentage was lower ($p = 0.02$). CD8⁺ CD45RO⁺ was higher ($p = 0.009$) and there was a lower percentage of CD8⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁺ population in patients with ECh ($p = 0.005$). No significant differences were observed for the other cell populations analyzed.

These data demonstrate the presence of active myocarditis resulting from persistent infection and low dose of the parasite in patients with CCC. This myocarditis is characterized by the presence of proinflammatory cells that favor damage to the cardiac tissue and contribute to the maintenance of heart failure. The persistence of parasite antigens for decades would probably be affecting the immune response leading to an altered T cell response.

*Bachelor thesis

**Health Faculty. Biomedical Sciences Master. Project Director Clara Isabel González Rugeles. *MSc en Microbiología, PhD Ciencias Biológicas.*

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (ECh) o tripanosomiasis americana es causada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y transmitida por insectos hematófagos pertenecientes a la sub-familia Triatominae. Pese a ser descubierta en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas, la enfermedad permanece en el olvido y representa un grave problema de salud pública en América Latina. Se calculan de 6 a 8 millones de personas infectadas en el mundo (OMS, 2016) y cerca de 109 millones habitan en áreas de riesgo, la gran mayoría de ellas distribuidas en 21 países de América Latina. (WHO/ PAHO, 2016).

La Cardiomiopatía Chagásica Crónica (CCC) es la principal y más importante manifestación clínica de la ECh y es responsable de al menos 12.000 muertes anuales en zonas endémicas (WHO 2016). Aunque los factores que inciden en la progresión clínica a CCC no están aun claramente establecidos, se sabe que el tipo de respuesta inmune es un elemento clave en la patogénesis de la enfermedad (Cunha-Neto *et al.*, 2014). La CCC se caracteriza por presentar infiltración de células mononucleares, daño significativo de las fibras cardíacas y fibrosis. Se ha demostrado clínicamente que los pacientes con CCC registran una tasa de mortalidad mayor que los pacientes con cardiopatía dilatada de otra etiología, lo cual se ha relacionado en gran medida con las características del proceso inflamatorio propio de la CCC (Barbosa *et al.*, 2011).

Estudios comparativos del fenotipo de células mononucleares de sangre periférica en pacientes con CCC y asintomáticos han evidenciado aumento de linfocitos Th1 productores de INF γ . Además se ha observado disminución tanto de células Th2 (Gomes *et al.*, 2003) como de linfocitos T con fenotipo regulador CD4⁺CD25^{high}FoxP3 (de Araujo *et al.*, 2012) y células Th17 (Magalhaes *et al.*, 2013). Otros estudios han demostrado la presencia de células específicas contra *T. cruzi* con fenotipo doble positivo (Giraldo *et al.*, 2011), diferentes perfiles de células T CD8 incluyendo LT CD8 granzima A⁺ y Pfn⁺ (Dos Santos *et al.*, 2014), células T con fenotipo CCR5⁺INF γ y

CXCR9⁺INF γ (Gomes *et al.*, 2005) y linfocitos B (Fernández *et al.*, 2014). Aunque este tipo de estudios en células sanguíneas aporta información significativa acerca de las diferentes subpoblaciones circulantes de células T en pacientes con CCC, aún no se dispone de suficiente información que permita contrastar estos hallazgos con el proceso inflamatorio que ocurre en el corazón. Si bien, se ha demostrado claramente en el infiltrado cardiaco el fenotipo Th1, se conoce poco sobre la presencia de otras subpoblaciones de células T, que estén modulando la reacción inflamatoria en este órgano. Teniendo en cuenta estos hallazgos, es importante destacar que la caracterización del infiltrado inflamatorio en el tejido cardiaco aportaría información valiosa para el esclarecimiento del papel de la respuesta inmune en la progresión y severidad de la enfermedad.

Esta caracterización fenotípica clásicamente se ha realizado mediante técnicas inmunohistoquímicas que permiten la visualización espacial de las células y su clasificación. No obstante, esta metodología es insuficiente a la hora de realizar un análisis fenotípico y cuantitativo más profundo, debido a que se limita a una pequeña porción del órgano, implica la evaluación de un marcador celular a la vez y la técnica en ocasiones resulta engorrosa. Por su parte, la citometría de flujo es un método eficiente en cuanto a la caracterización cuantitativa de células individuales y el estudio multiparamétrico del fenotipo celular al permitir el marcaje simultáneo de las células con varios fluorocromos y la posibilidad de evaluar más de 10.000 eventos por segundo (Mahnke *et al.*, 2007). Por lo tanto el presente trabajo de investigación, debido a la importancia que tiene el infiltrado inflamatorio en la patogénesis de la enfermedad y a los escasos estudios publicados, utilizó la citometría de flujo como método de análisis fenotípico para determinar el infiltrado inflamatorio de tejido de pacientes con CCC comparado con el de individuos con cardiomiopatía dilatada idiopática.

1. ENFERMEDAD DE CHAGAS

La ECh o Tripanosomiasis americana es conocida como una enfermedad potencialmente mortal, causada por el parásito hemoflagelado *T. cruzi* y transmitida por insectos hematófagos pertenecientes a la sub-familia Triatominae. La enfermedad fue descrita en 1909 por el médico e investigador brasileño Carlos Chagas y desde entonces se ha vinculado como una de las más importantes causas de morbi-mortalidad en nuestro país y en el resto de América Latina. Se estima que cerca de 8 millones de personas están infectadas alrededor del mundo y al menos 12.000 mueren anualmente por complicaciones asociadas a la ECh. La enfermedad cursa con dos fases clínicas; la fase aguda inicial se caracteriza por presentar alta parasitemia y en la mayoría de los casos los síntomas están ausentes o son subclínicos. Durante la fase crónica *T. cruzi* permanece restringido a ciertos órganos y tejidos como el corazón y/o el músculo digestivo. Se estima que cerca del 30% de los pacientes que progresan hacia la fase crónica desarrollan CCC siendo esta la más importante manifestación clínica de la ECh, mientras que otro 10% sufre la forma digestiva (WHO 2016).

1.1. EPIDEMIOLOGÍA

La ECh es uno de los problemas más significativos en el continente americano en términos de salud humana e impacto socioeconómico (Bermudez *et al.*, 2016). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la ECh hace parte del grupo de las 17 enfermedades tropicales desatendidas, las cuales afectan principalmente a pacientes de escasos recursos que viven en países en vía de desarrollo (WHO 2013). Las regiones endémicas de la enfermedad se extienden desde la latitud 42°N hasta la latitud 40°S lo que significa que la infección por *T. cruzi* está presente desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina. (Moncayo *et al.*, 2009). Históricamente la transmisión y morbilidad de la enfermedad estaban confinadas al continente americano, sin embargo, como consecuencia de la migración en las últimas décadas se ha incrementado la detección de pacientes seropositivos en

países en los cuales la enfermedad no es endémica (Estados Unidos, Canadá, España, Francia, Suiza, Italia y Australia), convirtiendo a la ECh en un problema de salud pública de interés mundial (Figura 1).

Figura 1. Número estimado de inmigrantes con infección por *T. cruzi* viviendo en países no endémicos. Tomado de Rassi *et al* 2016.



La OMS ha estimado que existen cerca de 6 a 7 millones de personas infectadas a nivel mundial mientras que otros 109 millones de personas habitan en zonas de alto riesgo. La más alta prevalencia de la ECh ha sido reportada en Bolivia (6,8%), Argentina (4,1%), El Salvador (3,4%), Honduras (3,1%) y Paraguay (2,5%) (Rassi *et al.*, 2010). Adicionalmente se estima en 2 millones el número de mujeres en edad fértil infectadas, de las cuales entre un 4-8% transmitirá la enfermedad por vía transplacentaria (Vega *et al.*, 2015).

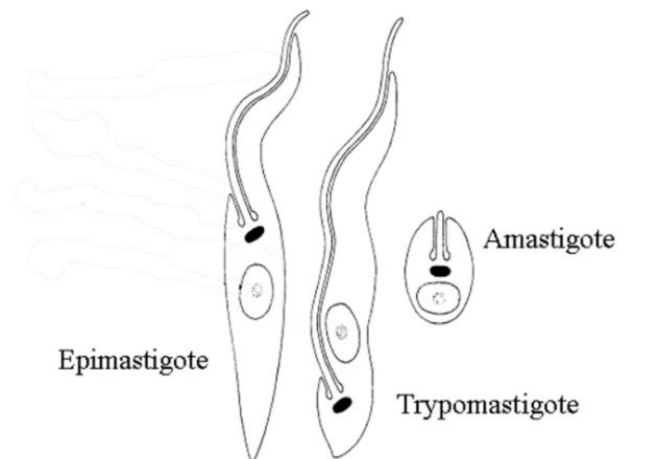
En Colombia se estima entre 700.000 y 1.200.000 habitantes infectados, 8 millones en riesgo de adquirir la infección y más de 131.000 individuos con CCC. De acuerdo al Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) en el año 2015 se notificaron 905 casos de Chagas, los departamentos con mayor número de casos reportados

fueron: Santander (173), Casanare (156), Boyacá (126), La Guajira (83) y Cesar (70) (Vega *et al.*, 2015).

1.2. EL PARÁSITO

T. cruzi es un parásito intracelular obligado perteneciente al orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*. Se caracteriza por presentar un flagelo y una única mitocondria en la cual se sitúa una organela que contiene DNA especializado denominado cinetoplasto (Brener., 1973). El parásito presenta tres estadios morfológicos y funcionales diferentes en su ciclo de vida: epimastigote, tripomastigote y amastigote (Brener., 1973) con formas intermedias entre cada uno de ellos (Bourguignon *et al.*, 2006). Morfológicamente los estadios se pueden diferenciar por la ubicación del cinetoplasto en relación al núcleo y la presencia o no de membrana ondulante.

Figura 2. Estadios de *Trypanosoma cruzi*

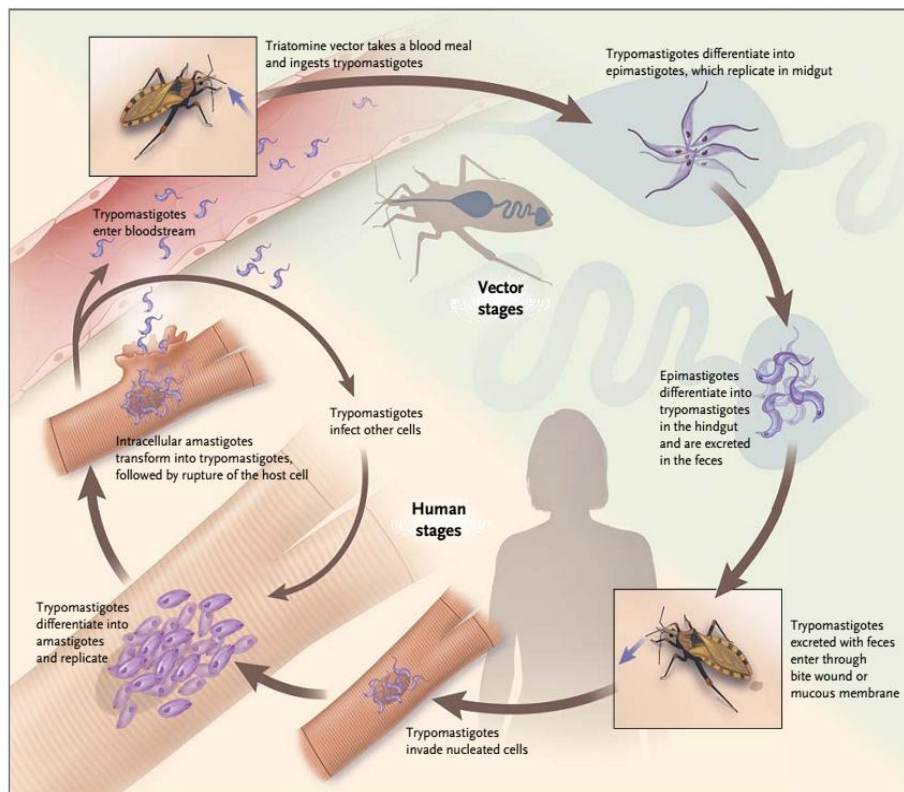


Los epimastigotes son formas alargadas del parásito en las cuales el cinetoplasto se ubica anterior al núcleo, biológicamente representan el estadio replicativo en el insecto vector por lo cual es posible encontrarlos en el tubo digestivo de los hospederos invertebrados. Los tripomastigotes son mucho más alargados y finos que los epimastigotes y a diferencia de éstos presentan un flagelo ondulante a lo largo del cuerpo del parásito y cinetoplasto posterior al núcleo. Son las formas

infectivas del hospedero vertebrado y es posible encontrarlas tanto en el insecto vector como en sangre y espacio intercelular de hospederos vertebrados. Los amastigotes son células redondeadas con cinetoplasto anterior al núcleo y flagelo corto, es posible encontrarlas en células de hospederos infectados formando nidos como ocurre en los cardiomiocitos (Brener, 1973; Díaz *et al.*, 2014) (Figura 2).

1.2.1. Ciclo de vida *T. cruzi* presenta un ciclo de vida complejo que involucra un hospedero invertebrado y uno vertebrado. El ciclo inicia cuando el vector se alimenta con sangre de un huésped mamífero infectado e ingiere tripomastigotes circulantes, los cuales se diferencian a epimastigotes en el intestino medio del vector. Posteriormente los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos infecciosos que son excretados por las heces del vector (Bern, 2015) (Figura 3).

Figura 3. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Tomado de Bern, 2015.



La infección del hospedero vertebrado ocurre cuando los tripomastigotes metacíclicos entran a través de la lesión cutánea causada por la picadura del insecto e invaden varios tipos de células nucleadas incluyendo células epiteliales, macrófagos, fibroblastos y células musculares. Una vez en el citoplasma, los tripomastigotes se diferencian en amastigotes, que es la forma replicativa del parásito dentro de las células de mamífero. Los amastigotes se duplican aproximadamente cada 12 horas durante un periodo de tiempo de 4 a 5 días, al finalizar este periodo se transforman en tripomastigotes, se produce la ruptura de las células hospederas liberando los tripomastigotes a la circulación, de tal forma que puedan iniciar nuevos ciclos de replicación o ser ingeridos por el vector (Bern., 2015; Rassi *et al.*, 2010; Tyler *et al.*, 2001) (Figura 3).

1.2.2 Vías de transmisión La ECh es transmitida a los seres humanos y a más de 150 especies de animales domésticos y selváticos (perros, gatos, roedores y armadillos) principalmente por vía vectorial, sin embargo existen otras formas de transmisión dentro de las que se encuentran: la transmisión vertical de madre a hijo, la oral por ingesta de alimentos contaminados, la transfusión sanguínea y de órganos y en menor medida la accidental.

1.2.2.1. Transmisión vectorial Esta forma de transmisión se considera la más importante en humanos y se estima que está involucrada en al menos el 70% de los casos (Pinazo *et al.*, 2015). La transmisión tiene lugar cuando insectos hematófagos pertenecientes a la subfamilia *Triatominae* se alimentan del huésped vertebrado y liberan tripomastigotes metacíclicos con las heces, los cuales son introducidos mecánicamente por el acto de rascarse o penetran activamente por el sitio de la picadura y/o mucosas (Rassi *et al.*, 2010).

Este tipo de transmisión se presenta exclusivamente en el continente americano donde se han identificado más de 130 especies de triatominos, sin embargo tan solo algunas de ellas son vectores competentes de *T. cruzi*. *Triatoma infestans*,

Rhodnius prolixus y *Triatoma dimidiata* son las tres especies de vectores más importantes en la transmisión de *T. cruzi* al humano. (Lazzari *et al.*, 2013).

1.2.2.2. Transfusión de sangre y trasplante de órganos Es considerada la principal forma de transmisión de la enfermedad en países no endémicos. El riesgo de adquirir la enfermedad luego de la transfusión de una unidad de sangre contaminada es menor al 10% y está relacionada con algunos factores como la concentración del parásito, el hemocomponente transfundido e incluso la cepa del parásito (Rassi *et al.*, 2010). El riesgo de transmisión se ha visto aumentado por la transfusión de plaquetas más que por otro tipo de hemoderivado (Rassi *et al.*, 2010).

El trasplante de órganos ha aparecido como una nueva ruta para la transmisión de la enfermedad, en este caso particular los pacientes desarrollan la forma aguda de la enfermedad debido al proceso de inmunosupresión que deben afrontar (Pinazo *et al.*, 2015; Barcán *et al.*, 2005).

1.2.2.3. Transmisión vertical Esta ruta de transmisión representa un reto para los países endémicos de la enfermedad, la OMS calcula que el número de casos nuevos debidos a esta ruta de transmisión pueden superar los 8.000 por año. En Bolivia, Chile y Paraguay la transmisión congénita ocurre en el 5% de las mujeres embarazadas crónicamente infectadas, mientras que en el resto de países endémicos se calcula en menos del 1% (Rassi *et al.*, 2012).

1.2.2.4. Transmisión oral La transmisión oral de la ECh es considerada como una forma rara e inusual, sin embargo llama la atención por la presentación de microbrotes de infección aguda en zonas desprovistas de insectos vectores domiciliados (Díaz *et al.*, 2015). La ingesta de alimentos contaminados tales como jugo de caña de azúcar o carne cruda generalmente se asocia con infestación masiva de parásitos, lo que resulta en una fase clínica aguda más severa y con tasas de mortalidad más altas (Pereira *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2015).

1.2.2.4. Transmisión accidental Se presenta por el contacto de piel con microlesiones o mucosas con elementos contaminados. Generalmente se asocia a la manipulación inadecuada de elementos cortopunzantes o material de investigación contaminado con sangre de pacientes infectados o heces de triatominos (Dias *et al.*, 2011).

1.3. ESTADÍOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD

La ECh comprende dos etapas diferenciadas desde el punto de vista clínico, parasitológico e histopatológico. La fase inicial o fase aguda cursa con sintomatología inespecífica y bajo índice de mortalidad, mientras que la fase crónica se presenta con sintomatología y compromiso cardíaco y/o gastrointestinal. Estas dos etapas están separadas por un periodo asintomático de tiempo variable.

1.3.1. Fase aguda La fase aguda de la enfermedad generalmente cursa asintomática o se presentan síntomas inespecíficos como fiebre, malestar general, hepato-esplenomegalia y linfocitosis atípica, los cuales se manifiestan luego de un periodo de incubación de 1 a 2 semanas (Rassi *et al.*, 2012). Cuando la transmisión de la enfermedad es vectorial es posible identificar signos de entrada del parásito a través de la piel, por la presencia de un área indurada con eritema e hinchazón denominada chagoma o a través de las mucosas donde se presenta edema indoloro unilateral de los tejidos perioculares y del párpado (signo de Romaña) (Coura, 2007).

Una de las principales características de la fase aguda es la presencia de *T. cruzi* en sangre periférica, por lo cual es posible detectar el parásito mediante examen microscópico. La parasitemia disminuye gradualmente luego del establecimiento de la respuesta inmune.

Las manifestaciones clínicas en la fase aguda se resuelven espontáneamente y menos del 1% de los pacientes desarrollan complicaciones debido a meningoencefalitis o miocarditis. En este último caso los pacientes pueden mostrar

en el electrocardiograma (ECG) taquicardia sinusal, bloqueo auriculoventricular de primer grado, bajo voltaje QRS o cambios en la onda T; mientras que en una radiografía de tórax podrían evidenciarse grados variables de cardiomegalia (Bern *et al.*, 2011; Rassi *et al.*, 2000).

1.3.2 Fase crónica indeterminada La mayoría de los pacientes se recuperan de la fase aguda y entre el 60-70% de ellos nunca desarrollarán sintomatología clínica de la enfermedad (Rassi *et al.*, 2012), entrarán en la fase indeterminada la cual solo puede ser sospechada por nexos epidemiológicos y diagnosticada por positividad para anticuerpos anti-*T cruzi* en el suero.

1.3.3. Fase crónica sintomática Se estima que el 20 al 30% de las personas infectadas progresan a través de los años o décadas a la fase crónica de la enfermedad con alteraciones en el corazón, el esófago, el colon o una combinación de ellas.

1.3.3.1. Forma cardiaca El compromiso cardiaco es la manifestación más seria y frecuente de la enfermedad crónica y se desarrolla en el 20-30% de los individuos seropositivos. Los síntomas iniciales generalmente incluyen defectos en el sistema de conducción y alteraciones ritmogénicas como bradicardia y taquicardia. Los pacientes eventualmente progresan a cardiomiopatía dilatada y falla cardiaca congestiva. Otras complicaciones incluyen aneurismas ventriculares, accidentes cerebrovasculares y eventos tromboembólicos (Acquatella, 2007).

Las anomalías electrocardiográficas más comunes son el bloqueo de la rama derecha o bloqueo fascicular anterior izquierdo, extrasístoles ventriculares, cambios ST-T, anomalías en la onda Q y bajo voltaje QRS (Rassi *et al.*, 2012).

La falla cardiaca de etiología chagásica se asocia con más alta mortalidad que la falla cardiaca por otras causas (Freitas *et al.*, 2005). Dos tercios de los pacientes en

fase crónica cardiaca fallecen debido a muerte cardiaca súbita, seguido por falla cardiaca refractaria (25-30%) y tromboembolismo (10-15%) (Rassi *et al.*, 2001).

1.3.3.2. Forma digestiva La forma digestiva de la enfermedad afecta del 10 al 15% de los pacientes crónicamente infectados. Tiene especial importancia en países localizados al sur de la cuenca del Amazonas como Argentina, Brasil, Bolivia y Chile. La marcada distribución geográfica que presenta esta forma de la enfermedad obedece principalmente a las cepas del parásito que circulan en la región (Campbell *et al.*, 2004).

Se caracteriza por presentar lesiones en el sistema nervioso entérico lo que conduce a alteraciones en las funciones de absorción, motoras y secretoras del esófago y del tracto gastrointestinal. La denervación es un proceso discontinuo e irregular, afecta principalmente el plexo mientérico de Auerbach y conduce a la pérdida de la coordinación motora y la acalasia de los esfínteres lo que desencadena la dilatación del esófago y el colon distal principalmente (Rassi *et al.*, 2012).

Pacientes con megaesófago presentan disfagia, odinofagia, asociado a dolor epigástrico, regurgitación y malnutrición, mientras que aquellos con megacolon manifiestan afectaciones a nivel del segmento sigmoideo con estreñimiento prolongado, distensión abdominal y en algunas ocasiones obstrucción del intestino grueso (Rassi *et al.*, 2010; Marin-Neto *et al.*, 2010).

1.3.3.3. Forma cardiodigestiva Se denomina de esta manera a la combinación de la enfermedad cardiaca con megaesófago y/o megacolon. En algunos países es usual que el megaesófago preceda a la aparición de la enfermedad cardiaca o del colon (Rassi *et al.*, 2012).

1.4. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

El diagnóstico depende de la fase en la que se encuentre el paciente. En la fase aguda de la enfermedad el diagnóstico se basa principalmente en la detección del parásito en sangre. Tripomastigotes móviles pueden detectarse mediante el examen microscópico de sangre fresca anticoagulada o “buffy coat”, o mediante la utilización de métodos parasitológicos directos como gota gruesa, método de Strout y microhematocrito. Este último es el método de elección para identificar infección congénita debido a que presenta mayor sensibilidad y requiere menor cantidad de sangre (Gomes *et al.*, 2009). Aunque las pruebas serológicas no son ampliamente utilizadas en el diagnóstico de la Ech en fase aguda, la detección de inmunoglobulina M (IgM) anti-*T. cruzi* puede ser una aproximación útil.

Debido a la escasa presencia del parásito en sangre durante la fase crónica, el diagnóstico se realiza empleando métodos serológicos como inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunocromatografía o hemaglutinación indirecta (HAI) los cuales permiten la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* de tipo IgG. Se recomienda tener al menos dos resultados positivos de estas técnicas convencionales para obtener un diagnóstico definitivo (Gomes *et al.*, 2009)

El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como herramienta diagnóstica ha aumentado, sin embargo la sensibilidad de esta en la fase crónica de la enfermedad es variable y depende de algunos aspectos como el volumen de la muestra, las condiciones de procesamiento, los iniciadores empleados y las condiciones de amplificación (Schijman *et al.*, 2011).

1.5. TRATAMIENTO

A pesar de haber sido descrita hace más de un siglo, la ECh aún no dispone de un tratamiento quimioterapéutico eficaz. Hasta la fecha no existe un fármaco ideal que actúe exclusivamente sobre el parásito sin producir efectos tóxicos colaterales.

Al igual que otras enfermedades tropicales desatendidas la ECh es endémica en países en vía de desarrollo y algunos de los medicamentos necesarios para su tratamiento no están autorizados en países industrializados, por tanto no cuentan con el aval de las agencias regulatorias de medicamentos (Bermudez *et al.*, 2016). Por lo anterior y por otras causas, actualmente solo existen dos fármacos tripanocidas aprobados para el tratamiento de la ECh en humanos el Benznidazol y el Nifurtimox, ambos comercializados desde la década de 1970 y recomendados para el tratamiento de infección aguda, congénita y reactivación de la enfermedad (Bern *et al.*, 2007). El tratamiento tripanocida está contraindicado durante el embarazo y en pacientes con insuficiencia renal y hepática severa (Rassi *et al.*, 2001). Tanto el Benznidazol como el Nifurtimox presentan algunas características en común: mejor tolerancia en niños, mayor eficiencia durante la fase aguda de la enfermedad, alta toxicidad en adultos y diferentes grados de resistencia, lo que tiene relación con la DTU de *T. cruzi* (Bermudez *et al.*, 2016; Trischmann., 1982).

El mecanismo de acción del Nifurtimox está basado en su reducción intracelular lo que origina el radical nitro anión (R-N O⁻²), este compuesto entra en un ciclo redox generando radicales libres (O⁻² y H₂O₂) altamente tóxicos para el parásito pues no posee los mecanismos necesarios para su eliminación. En el caso del benznidazol, se producen metabolitos del grupo nitro reducido, los cuales se unen covalentemente a compuestos celulares (Maya *et al.*, 1997). Sin importar el mecanismo de acción con ambas drogas se consigue la disminución del glutatión, tripanotiona y glutationil espermidina, compuestos involucrados en el mantenimiento del equilibrio redox del parásito (Maya *et al.*, 1997).

1.5.1. Tratamiento de los síntomas cardiacos Los pacientes que desarrollan la forma cardíaca de la ECh deben ser remitidos con especialistas para asegurar un adecuado tratamiento de los síntomas. En pacientes con alteraciones arritmogénicas malignas y disfunción miocárdica se recomienda el uso de amiodarona, aquellos que manifiestan taquicardia ventricular sostenida

hemodinámicamente inestables son tratados con desfibriladores automáticos implantables (Muratore *et al.*, 2009).

El trasplante cardíaco es una alternativa para pacientes con falla cardíaca terminal y algunos hallazgos sugieren que la supervivencia de los pacientes chagásicos trasplantados es mayor que aquellos trasplantados debido a otra enfermedad cardíaca (Bocchi *et al.*, 2001).

1.6. PATOGÉNESIS DE LA ECh

Los mecanismos involucrados en la patogénesis de la ECh aún permanecen inconclusos, sin embargo mediante estudios realizados en modelos animales y en humanos se ha propuesto la existencia de al menos 4 mecanismos que explican la patogénesis de la CCC: la disautonomía cardíaca, las alteraciones microvasculares, el daño del miocardio dependiente del parásito y el daño mediado por la respuesta inmune (Marin-Neto *et al.*, 2007; Bilate *et al.*, 2008).

1.6.1 Disautonomía cardíaca Desde los estudios preliminares realizados por Carlos Chagas y Fritz Koberle en tejido cardíaco de pacientes con alteraciones patológicas causadas por la ECh, se pudo establecer que la gran mayoría de ellos presentaba intensa despoblación neuronal así como daño ganglional y reducción del conteo absoluto de neuronas subepicárdicas intramurales (Köberle, 1968).

La pérdida neuronal en la ECh ocurre predominantemente durante la fase aguda de la enfermedad y participan tres mecanismos: parasitismo de las neuronas, degeneración causada por inflamación periganglionar y una reacción inmune antineural (Ribeiro dos Santos, 1981). La hipótesis neurogénica establece a la CCC como una consecuencia del desequilibrio autonómico de larga duración que conduce finalmente a una cardiopatía por catecolaminas. Sin embargo la patogénesis de la ECh es mucho más compleja y no puede ser explicada únicamente por esta causa (Marin-Neto *et al.*, 2007).

1.6.2. Alteraciones microvasculares La evidencia clínica sugiere que las anomalías en la microvasculatura conducen a isquemia miocárdica y por tanto a la patogénesis de la ECh. Investigaciones realizadas en torno a esta teoría han demostrado que las anomalías en los procesos de vasoconstricción y vasodilatación a nivel microcirculatorio provocan daño miocárdico de pacientes con ECh (Marin-Neto et al., 2007).

La coalescencia de microinfartos en las áreas con sobreestimulación simpática ha sido postulada como uno de los factores que conduce a la aparición de aneurisma apical, relacionando de esta forma la hipótesis microcirculatoria y la teoría neurogénica de la ECh (Oliveira *et al.*, 1985).

1.6.3. Daño miocárdico relacionado con la persistencia crónica del parásito El rol del parásito en el daño del tejido cardíaco durante la fase crónica de la enfermedad ha sido ampliamente cuestionado. A diferencia de lo que se observa en la fase aguda de la ECh, en la fase crónica la presencia del parásito es casi indetectable utilizando técnicas histológicas tradicionales y no en todos los casos, existe correlación topográfica entre los focos inflamatorios y los nidos de amastigotes (Andrade *et al.*, 2005).

Con la puesta en marcha de nuevas técnicas más sensibles como la inmunohistoquímica, la PCR y la hibridación *in situ* ha sido posible la identificación de antígenos y material genético de *T. cruzi* en los focos inflamatorios. Aunque se ha establecido una correlación entre la carga parasitaria en el tejido y la intensidad del proceso inflamatorio en modelos experimentales, estos hallazgos no se han podido replicar en muestras de pacientes humanos (Olivares-Villagomez *et al.*, 1998; Palomino *et al.*, 2000). Andrade y colaboradores demostraron al menos experimentalmente que la persistencia de *T. cruzi* guarda relación con la patogénesis de la fase crónica, ya que al disminuir la carga parasitaria con tratamientos antitripanocida en ratones infectados, estos mostraron menores efectos crónicos a nivel cardíaco (Andrade *et al.*, 1991).

Estudios conducidos en seres humanos han confirmado la presencia de material genético de *T. cruzi* en tejido de pacientes con CCC, sin embargo éste no se detecta en autopsias de tejido cardiaco de pacientes seropositivos que fallecen sin signos de enfermedad cardiaca (Jones *et al.*, 1993), corroborando de esta forma la participación del parásito en el daño al tejido cardiaco. Otros estudios han demostrado que la ECh no se mantiene ni se desarrolla en ausencia de la infección (Tarleton, 2003).

1.6.4. Mecanismo inmunológico Existe gran cantidad de evidencia científica que soporta el papel de la respuesta inmune como uno de los principales actores involucrados en el daño del tejido cardiaco (Marin-Neto *et al.*, 2007), no obstante la naturaleza de los antígenos que inducen la respuesta inmunológica permanecen aún inconclusos. Como se mencionó anteriormente se ha demostrado la persistencia crónica de antígenos de *T. cruzi* en el tejido cardiaco, estímulos que se han asociado con el reclutamiento y la expansión de subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ específicos para *T. cruzi* en pacientes con CCC (Fonseca *et al.*, 2005). Sin embargo este tipo de antígenos son escasos en el tejido cardiaco y no siempre se asocian con procesos inflamatorios pues se han encontrado cardiomiocitos altamente parasitados con nidos de amastigotes libres de infiltrado leucocitario (Marin-Neto *et al.*, 2007).

El infiltrado inflamatorio está compuesto principalmente por células mononucleares incluyendo macrófagos, linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ granzima⁺ y Pfn⁺ estas últimas si bien ayudan a la eliminación del parásito también se asocian con daño cardiaco (Dos Santos *et al.*, 2014). Por otra parte, en pacientes con CCC es evidente un desbalance en la producción de citoquinas, con exacerbada producción de citoquinas proinflamatorias de tipo Th1 (TNF α e INF γ) y supresión del perfil Th2 (Teixeira *et al.*, 2002). La producción de INF γ se encuentra significativamente aumentada en pacientes con CCC por lo cual se sugiere que actúa como mediador de la inflamación crónica y contribuye a la patogénesis de la ECh (Marin-Neto *et al.*, 2007).

1.7. RESPUESTA INMUNE EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

El sistema inmune es una red interactiva de órganos, células y moléculas cuya función esencial es la defensa del individuo frente a agentes patógenos. Bajo condiciones normales el sistema inmune tiene la capacidad de reconocer, procesar y eliminar patógenos y/o elementos extraños. Por el contrario, situaciones de inmunosupresión conducen a infecciones graves o tumores mientras que la hiperactividad del sistema inmunológico se relaciona con enfermedades alérgicas y autoinmunes. Dependiendo de la naturaleza del patógeno, el sistema inmune desencadena mecanismos efectores de respuesta inmune innata y adquirida que responden de manera distinta y especializada (Parkin, 2001).

En el caso de la ECh, el control de *T. cruzi* depende tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa, e involucra macrófagos, células Natural Killer (NK), linfocitos T y B y la producción de citoquinas proinflamatorias de tipo Th1 como INF γ , TNF α e IL-12.

1.7.1 Respuesta inmune innata Durante la fase aguda de la ECh, *T. cruzi* induce la síntesis sistemática de citoquinas proinflamatorias y la activación de componentes de la respuesta inmune innata. Estudios en modelos experimentales han mostrado que los macrófagos, las células dendríticas y las células NK tienen un papel importante en el control del parásito ya que desencadenan una fuerte reacción inflamatoria con aumento en la liberación de citoquinas y quimioquinas (Machado *et al.*, 2012).

El reconocimiento de *T. cruzi* por los macrófagos y otros tipos de células involucra a los miembros de una familia de proteínas transmembranales conocidos como Toll Like Receptor (TLR), los cuales reconocen estructuras químicas altamente conservadas en los patógenos llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los TLRs transmiten las señales a través de los dominios citoplasmáticos Toll/IL-R1 y reclutan moléculas adaptadoras citoplasmáticas especialmente la proteína 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD88), con la subsecuente activación del factor nuclear $\kappa\beta$ (Machado *et al.*, 2012).

Estudios realizados en modelo murino han identificado una serie de moléculas de *T. cruzi* que actúan como agonistas de los TLR, e inducen la producción y secreción de óxido nítrico (ON) así como de citoquinas proinflamatorias (Rodrigues *et al.*, 2012) (Tabla 1).

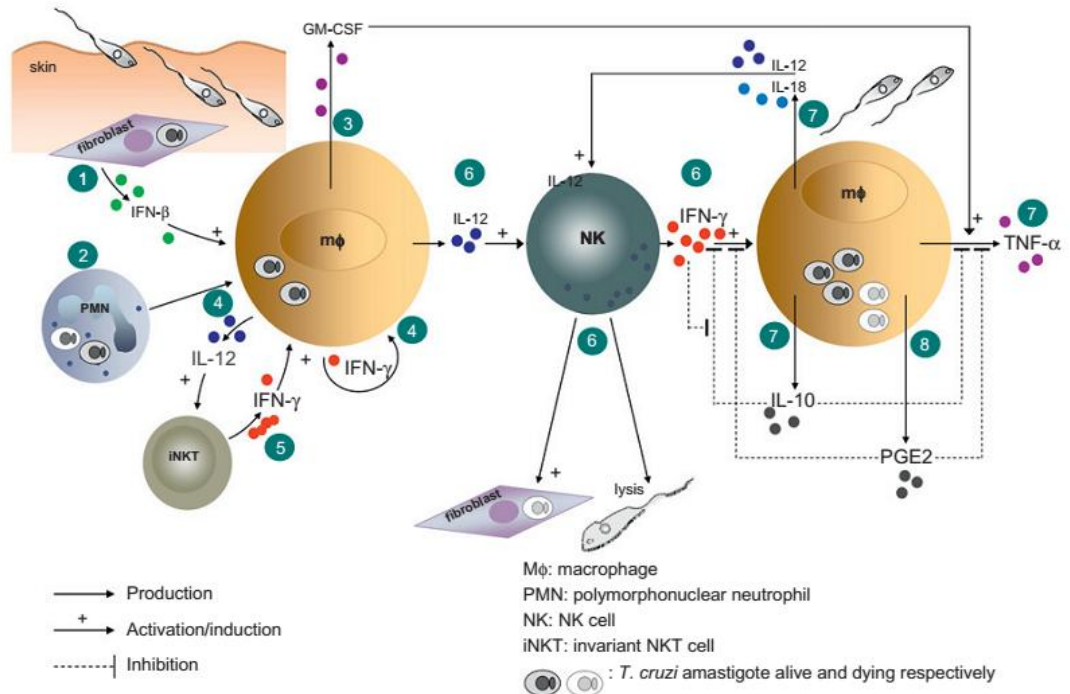
Tabla 1. TLRs implicados en el reconocimiento de PAMPs derivados de *T. cruzi*

TLR	Agonista	Efecto
TLR 2	Glicofosfatidilinositol derivado de tripomastigote (tGPI)	Induce la producción de IL-12, TNF α y ON
TLR 4	Glicoinositolfosfolípido derivado de epimastigote (eGIPL)	Induce activación de la vía NF- κ B, con aumento en la producción de ON y ROS
TLR 7	RNA	Liberación de citoquinas por macrófagos y células dendríticas
TLR 9	Motivos CpG	

Aparentemente la activación temprana del sistema inmune innato está involucrada con la resistencia a la infección por *T. cruzi*. Se ha demostrado que la activación de NF- κ B y la fosforilación de MAPKs en macrófagos y células dendríticas (Golgher *et al.*, 2004; Hall *et al.*, 2000) inducen la producción de IL-12 y TNF α , citoquinas que a su vez median la producción de INF γ en las células NK, favoreciendo de esta forma la diferenciación de los linfocitos Th₀ hacia el fenotipo Th1 (Figura 4). Adicionalmente en los macrófagos activados por TNF α e INF γ se aumenta la producción de ON conduciendo a la eliminación más eficiente del parásito (Michailowsky *et al.*, 2001). Cabe agregar que las células no inmunes también responden a la infección por *T. cruzi* con la producción de citoquinas. La infección de células endoteliales con el parásito conduce la producción de IL-1 β e IL-6, mientras que cardiomiocitos infectados exhiben un aumento en la concentración de RNAm de TNF α e IL-1 β (Machado *et al.*, 2012). Por otra parte se ha reportado la producción de citoquinas inmunomoduladoras como IL-10 y TGF- β en fase aguda de la enfermedad. La inhibición completa de citoquinas anti-inflamatorias Th2 en experimentos con modelos murinos desencadena efectos negativos severos como el desarrollo de un síndrome similar al shock endotóxico, a consecuencia del

aumento en la producción de TNF α e INF γ , demostrando así que la resistencia a la infección es un resultado del balance entre la producción de INF γ e IL-10 (Hölscher *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2012).

Figura 4. Desarrollo de la respuesta inmune innata en la infección por *T. cruzi*. Tomado de Telleria, 2010.



1.7.2 Inmunidad adquirida La información que soporta el papel de la respuesta inmune adquirida en el control de la infección por *T. cruzi* deriva de la observación tanto de pacientes como de animales de investigación que sobreviven a la fase aguda de la enfermedad. El componente central en la respuesta inmune adaptativa está dado por el rol que desempeñan los linfocitos B y T cuyas características principales son la especificidad antigénica y la generación de memoria inmunológica.

Las células dendríticas cumplen un papel muy importante en el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa, ya que se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos y actúan como centinelas al capturar, procesar y presentar antígenos a

las células T. Se ha observado que el número de células de Langerhans aumentan en la dermis del sitio de inoculación así como en los ganglios linfáticos de drenaje.

Adicionalmente, *T. cruzi* induce la maduración de las células dendríticas como lo indica el incremento en la expresión de marcadores de superficie como CD40, CD80, CD86 y moléculas de MHC clase I y II. También se ha demostrado que estas células producen IL-12 el cual es un fuerte inductor de la respuesta de tipo Th1 (Chaussabel *et al.*, 2003).

1.7.3 Inducción de la respuesta de células T La identificación de epítopes de *T. cruzi* que inducen la activación de los linfocitos T (LT) ha sido una tarea difícil debido al gran número de proteínas que codifica el parásito. Pese a lo anterior, se han identificado algunos epítopes presentados por MHC clase II a linfocitos T CD4⁺ de humano y de ratón como el dominio catalítico de la *trans*-sialidasa (TS), la variante SA85-1.1 de TS, la cruzipaína y KMP11 (Proteína de membrana de cinetoplasto de 11 KDa) (Telleria *et al.*, 2010).

A diferencia de lo que ocurre con las células T CD4⁺, la respuesta de los LT CD8⁺ parece ser inducida por un grupo más amplio de antígenos incluyendo: TSA1 (antígeno 1 de superficie de tripomastigote), ASP1 y 2 (proteínas de superficie de amastigote) y FL-160 (familia de antígenos asociados al flagelo de tripomastigotes) pertenecientes a la familia de TS (Fonseca *et al.*, 2005).

Una vez activados, los LT exhiben una mezcla en el perfil de citoquinas Th1/Th2 que producen. Datos obtenidos a partir de ratones infectados sugieren que la producción de INF γ es simultánea en las células T CD4⁺ y CD8⁺, mientras que la respuesta de tipo Th2 por parte de los LT CD4⁺ aparece más tardíamente (Kumar *et al.*, 2001). Cabe señalar que la inducción de los LT por un perfil particular de citoquinas (Th1 o Th2) está ampliamente gobernado por el microambiente de citoquinas en el cual se encuentran y en cierta medida por la fuerza de interacción entre el TCR y el Ag (Telleria *et al.*, 2010).

Adicionalmente, la expansión de las células T CD8⁺ es dependiente de estímulos provenientes de los linfocitos T CD4⁺ y de otras señales aún no identificadas que

inducen la expresión del factor de transcripción T-bet. Por otra parte, se ha comprobado en modelos murinos que las células T CD8⁺ pueden desarrollarse en ratones con ausencia de LT CD4⁺ sin embargo, el número de estas células no llegan a ser suficientes para controlar la infección (Tzelepis *et al.*, 2007).

1.7.4 Papel de los linfocitos T en el control de la infección No existe duda que el control de la infección en la fase aguda depende en gran medida de la respuesta mediada por los LT CD4⁺ y CD8⁺. Estudios en modelos experimentales utilizando ratones *knockout* que no presentan antígenos por MHC clase I o II y ratones en los cuales se inhibe la acción de los LT CD4⁺ o CD8⁺ por el uso de anticuerpos monoclonales, permiten observar que estos animales son más susceptibles a la infección por *T. cruzi* que la cepa silvestre. De esta forma se demuestra el papel crucial que desempeñan los LT en el control de la infección (Tarleton *et al.*, 1996; Padilla *et al.*, 2009).

El papel protector que cumplen los LT CD4⁺ Th1 incluye la activación de mecanismos tripanocidas en macrófagos mediante la liberación de INF γ , así como la inducción de la activación de las células T CD8⁺ y linfocitos B lo cual contribuye a la producción de isotipos de anticuerpos protectores (Hoft *et al.*, 2000). Por su parte, el principal mecanismo protector asociado a los LT CD8⁺ está relacionado con sus mecanismos citotóxicos. Los linfocitos CD8⁺ específicos del parásito presentan el fenotipo efector altamente funcional CD44^{hi} CD62^{lo} Ccr7^{lo} Cd127^{lo} y contribuyen a mantener controlado el número de células infectadas por el parásito en el tejido (Martin *et al.*, 2005).

1.7.5 Células T reguladoras Las células T reguladoras (Treg) son una subpoblación de células T caracterizadas fenotípicamente por la expresión de los marcadores de superficie CD4⁺ y CD25⁺ así como del factor de transcripción Foxp3⁺. Ejercen un rol importante en procesos de inmunoregulación en varios tipos celulares (linfocitos T y B, células dendríticas, macrófagos, NK etc.) mediante la liberación de citoquinas tales como IL-1, TGF- β , e IL-35. Además expresan CTLA-4, molécula implicada en el bloqueo de señales estimuladoras induciendo apoptosis y/o citólisis (Shevach., 2009). Datos obtenidos a partir de pacientes en fase indeterminada (IND) y cardíaca

de la enfermedad, han mostrado un incremento en la frecuencia de las células Treg en sangre periférica de los individuos IND, lo cual sugiere que la expansión de las células Treg puede ser benéfica durante la fase crónica de la enfermedad, al limitar el daño tisular (Vitelli-Avelar et al., 2005).

1.7.6 Linfocitos B y producción de anticuerpos La producción de anticuerpos (Ab) específicos contra *T. cruzi* comienza bastante tarde, detectándose altos niveles cuando la parasitemia comienza a decrecer, con lo cual se ha determinado que los Ab juegan un papel protector importante en la transición de la fase aguda a la fase crónica (Krettli et al., 1976). Una vez estimulados los linfocitos B, estos adquieren la capacidad de producir anticuerpos policlonales (IgG, IgM e IgA) tanto para antígenos de superficie como internos. En humanos se ha podido establecer que la proporción de anticuerpos específicos contra estructuras de superficie son más abundantes en la fase aguda, mientras que en la fase crónica son más frecuentes aquellos con especificidad contra antígenos internos (Umezawa et al., 1996). Las moléculas pertenecientes a la familia de TS son el principal blanco de los anticuerpos, especialmente una secuencia repetitiva localizada en el extremo C-terminal denominada SAPA (*shed acute phase antigen*). Por otra parte los anticuerpos reconocen el sitio catalítico de la TS, neutralizando de esta manera la actividad enzimática (Pitcovsky et al., 2002). Adicionalmente se ha determinado la presencia de otros anticuerpos neutralizantes como los dirigidos a las moléculas de tipo CRP (complement-regulatory proteins), TIF (trypanosomal immunosuppressive factor) y HSP70 (Norris et al., 1989; Engman et al., 1990).

La producción de IgG es dependiente del estímulo de los linfocitos T CD4⁺ y está restringida por el MHC de clase I. En la infección humana, la IgA aparece primero, seguida por la IgM y la IgG; en la fase aguda es posible detectar los picos más altos de IgA e IgM y son prácticamente indetectables en la fase crónica, mientras que la IgG persiste por toda la vida en pacientes no tratados (Garraud et al., 2003).

Los mecanismos efectores de los anticuerpos incluyen la lisis extracelular de tripomastigotes mediada por la activación del complemento y la inducción de

cambios estructurales en la membrana del parásito. Al menos dos tipos de anticuerpos están involucrados en este proceso. Por un lado se encuentran aquellos que reconocen y neutralizan estructuras como CRP con lo cual es posible la activación de la cascada del complemento sobre la superficie del parásito. Aquellos Ab que se unen a epítopes de superficie del parásito de tipo α -Gal inducen una deformación de la membrana causando la lisis de los tripomastigotes (Krautz *et al.*, 2000; Pereira-Chiocola *et al.*, 2000). Además de los mecanismos anteriores, los anticuerpos cumplen un papel muy importante como opsoninas al favorecer la eliminación de tripomastigotes circulantes. Esta función es dependiente de la porción Fc de los Ab y de la expresión de receptores Fc γ R en las células fagocíticas. Asimismo, se ha asociado a estos receptores con la inducción de INF γ y la disminución en la producción de IL-10 y TGF- β (Araujo-Jorge *et al.*, 1993; Telleria *et al.*, 2010).

1.7.7 Papel de la respuesta inmune en el desarrollo de la CCC La capacidad del hospedero para controlar la infección por *T. cruzi* no siempre resulta en la eliminación completa del parásito. La información que se tiene hasta el momento demuestra que uno de los posibles factores que desencadena la cardiopatía es la infiltración de células inflamatorias en el tejido cardíaco (células T CD4⁺ TNF α y células T CD8⁺ granzima⁺) como consecuencia de la persistencia de antígenos del parásito. Adicionalmente, hay evidencia que las citoquinas inmunoreguladoras son esenciales en la respuesta inmune, de tal forma que influyen el control o el desarrollo de la enfermedad. El análisis de datos obtenidos de diferentes estudios han conducido a la hipótesis que la forma indeterminada de la enfermedad se asocia con un perfil de citoquinas anti-inflamatorias representada principalmente por la expresión de IL-10; mientras que la forma cardíaca está asociada con una alta producción de INF γ y TNF α (Dutra *et al.*, 2014).

1.8. CARDIOPATÍA DILATADA

La Cardiomiopatía Dilatada (CD) es el tipo de cardiopatía más frecuente, se caracteriza por un incremento en la masa y el volumen del miocardio (Luk *et al.*, 2009; Elliott, 2000) y se presenta a consecuencia de una amplia variedad de patologías. La contractilidad del miocardio se ve comprometida debido al estiramiento y adelgazamiento de las paredes del corazón, lo que resulta en un funcionamiento alterado del ventrículo izquierdo. La CD puede presentarse en cualquier edad, sin embargo es más frecuente en varones de 20 a 50 años (Luk *et al.*, 2009).

Usualmente la CD presenta alguna de las siguientes alteraciones:

- Falla cardíaca con síntomas de congestión: edema, ortopnea, disnea paroxística nocturna y / o reducción del gasto cardíaco (fatiga, disnea de esfuerzo)
- Arritmias y/o enfermedades del sistema de conducción
- Enfermedad tromboembólica (trombo mural en ventrículo izquierdo) incluido el accidente cerebrovascular (Heshberger *et al.*, 2015)

Los factores genéticos son la principal causa de CD, se estima que entre el 25 al 35% de los pacientes tienen algún componente hereditario (Luk *et al.*, 2009). Sin embargo, muchas otras condiciones cardiovasculares, metabólicas, tóxicas e infecciosas pueden desencadenar una presentación clínica y patológica idéntica a la CD de etiología hereditaria. La miocarditis es responsable de la mayoría de casos de CD en América del Norte y se manifiesta como una complicación secundaria a infecciones virales (enterovirus, coxackie virus B3 y adenovirus), mientras que en América Central y del Sur la infección por *T. cruzi* es una de las más importantes causas de CD (Schofield *et al.*, 1999).

El término cardiomiopatía dilata idiopática (CDI) se aplica a la mayoría de los pacientes con cardiopatía no isquémica luego de la exclusión de todas las posibles causas identificables, excepto las genéticas (Hershberger *et al.*, 2015).

1.8.1 Cardiomiopatía chagásica crónica La ECh es la principal causa de enfermedad cardíaca y muerte relacionada con enfermedad cardiovascular en áreas endémicas de América Latina. La CCC es una cardiomiopatía dilatada inflamatoria (Abel *et al.*, 2001), afecta aproximadamente al 30% de las personas infectadas y se manifiesta de 5-30 años después de la infección aguda. Se calcula que la CCC es responsable de al menos 12.000 muertes anuales en zonas endémicas (Salvatella, *et al.*, 2013). Aproximadamente un tercio de los pacientes con CCC desarrollan un estado severo y letal de cardiomiopatía asociado a miocarditis con disfunción ventricular, falla cardíaca y arritmias. El único tratamiento disponible en los estados finales de la CCC es el trasplante cardíaco sin embargo dada la complejidad y el alto costo no está disponible para la mayoría de pacientes (Cunha-Neto *et al.*, 2014). Típicamente la CCC se manifiesta con intensa fibrosis miocárdica, destrucción del sistema de conducción, alteraciones microvasculares y alteración de las células endoteliales (De Lourdes Higuchi *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2010).

Los pacientes con alteraciones cardíacas crónicas pueden ser agrupados de acuerdo al grado de compromiso cardíaco. Existen varios esquemas de clasificación, sin embargo, el sistema empleado por el Colegio Americano de Cardiología y la Asociación Americana del Corazón (ACC/AHA por sus siglas en inglés) es el más difundido y agrupa a los pacientes en 4 categorías:

- Estadio A: infección por *T. cruzi* con electrocardiograma (EKG) y ecocardiograma normal
- Estadio B: infección por *T. cruzi* con anomalías en el EKG y/o anomalías menores en el ecocardiograma (anomalías segmentarias del movimiento de la pared, dilatación de la aurícula izquierda, aneurisma apical, disfunción diastólica) con función sistólica conservada (fracción de eyección (FE) $\geq 55\%$) y sin dilatación del ventrículo izquierdo
- Estadio C: Infección por *T. cruzi* con disfunción sistólica de leve a moderada (EF 40-54%) y / o dilatación del ventrículo izquierdo

- Estadio D: Infección por *T. cruzi* con disfunción sistólica severa (diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo ≥ 57 mm, FE $\leq 40\%$ y clasificación NYHA III o IV) (Hidron *et al.*, 2010).

1.8.2 Cardiomiopatía dilatada idiopática La Cardiomiopatía Dilatada Idiopática (CDI) es una enfermedad miocárdica de causa desconocida, caracterizada por la dilatación de uno o ambos ventrículos e inapropiada contractilidad del miocardio. El término Cardiomiopatía Dilatada Idiopática se empleaba antes de que surgiera la evidencia de la forma hereditaria, por tanto el diagnóstico de la CDI no distingue entre causas genéticas y no genéticas. Evidencia actual indica que la CDI puede ser hereditaria en aproximadamente el 20-35% de los casos (Hershberger *et al.*, 2015). Microscópicamente es posible observar cardiomiocitos irregulares e hipertróficos con núcleos hiper cromáticos así como pérdida miofibrilar, escaso infiltrado inflamatorio y microvasculatura de apariencia normal (Manolio *et al.*, 1992). Pocos estudios se han realizado para determinar la incidencia de la CDI, uno de ellos fue realizado en el condado de Olmsted- Minnesota Estados Unidos entre 1975 a 1984 donde se estimó la prevalencia de la CDI en 36,5: 100.000 (Manolio *et al.*, 1992).

1.8.3 CCC vs CDI Tanto la CCC como la CDI presentan alteraciones estructurales que conducen a la dilatación ventricular y al mal funcionamiento del corazón. A pesar de pertenecer ambas patologías al mismo grupo de alteraciones cardiacas, existen diferencias a nivel histopatológico que alertan sobre el uso de aproximaciones terapéuticas diferentes.

En contraste con la CCC, en la CDI generalmente no hay miocarditis y la fibrosis es menos severa (De Lourdes Higuchi *et al.*, 2003). Adicionalmente la ruptura de la matriz extracelular se asocia con el estiramiento y adelgazamiento de las fibras y por ende a la pérdida de funcionalidad en la CDI, mientras que en la CCC la acumulación de colágeno extracelular se asocia con procesos de distensión y contracción anormales de las fibras cardiacas (Weber *et al.*, 1988). Sumado a lo anterior, en el sarcolema del tejido cardiaco de pacientes con CCC pero no en tejido

de individuos con CDI, ha sido posible la identificación de las subunidades del complemento C5b-9 involucradas en la formación del complejo de ataque a membrana (MAC por sus sigla en inglés) por lo cual se han asociado al favorecimiento de la trombosis, liberación de factores de crecimiento y al proceso de fibrosis que rodea las fibras cardíacas (De Lourdes Higuchi *et al.*, 2003).

La pérdida de células miocárdicas es una característica común en ambas patologías sin embargo, el mecanismo por el cual se lleva a cabo este proceso parece ser opuesto. En pacientes con CCC se ha visto más relacionada la pérdida de cardiomiocitos con eventos necróticos (Rossi *et al.*, 1999), mientras que en pacientes con CDI, se ha determinado que la apoptosis es el mecanismo más frecuente (Metzger *et al.*, 2002).

2. JUSTIFICACIÓN

La ECh representa un grave problema de salud pública, se estima que 6 a 8 millones de personas padecen la enfermedad (OMS, 2015). En Colombia, la prevalencia de la enfermedad se ha calculado entre 700.000 y 1.200.000 habitantes infectados y 8 millones en riesgo de adquirir la infección (Vega *et al.*, 2015). El departamento de Santander ocupa el primer lugar de incidencia de la enfermedad a nivel nacional (SIVIGILA, 2015) con municipios donde la tasa de seropositividad supera el 40% (Gutierrez *et al.*, 2004; Estupiñan *et al.*, 2016). La CCC es la principal y más importante manifestación clínica de la enfermedad, se caracteriza por presentar miocarditis difusa y fibrosis extensa. El infiltrado mononuclear es abundante en células T CD8⁺ y CD4⁺ (fenotipo Th1) y macrófagos. Linfocitos B, células plasmáticas, eosinófilos y mastocitos también han sido descritos en menor frecuencia (Cunha-Neto *et al.*, 2014).

Poco se conoce acerca de los factores que determinan la susceptibilidad diferencial al desarrollo de CCC; sin embargo, se ha determinado que la respuesta inmune es uno de los elementos más influyentes en este proceso. A pesar de que existe mucha evidencia de las características fenotípicas de las células inflamatorias de sangre periférica de pacientes con CCC, se requiere más información sobre las subpoblaciones que infiltran el tejido cardiaco para determinar si hay correlación con las células circulantes y establecer asociaciones más claras con la inmunopatogénesis y la progresión a fase crónica de la enfermedad. Tradicionalmente la caracterización fenotípica en el tejido se ha realizado mediante técnicas inmunohistoquímicas, sin embargo el método es limitado cuando el propósito es la identificación y cuantificación de subpoblaciones celulares. Por ello, la citometría de flujo surge como un método eficiente y sensible que permite la caracterización fenotípica multiparamétrica y cuantitativa de diversos tipos de infiltrado inflamatorio (Afanasyeva *et al.*, 2004).

Debido a que son pocos los estudios que se han enfocado en determinar el patrón del infiltrado inflamatorio en tejido cardiaco de individuos con CCC y aún más escasos aquellos que implementan la citometría de flujo como método de análisis, el presente estudio tuvo por objetivo determinar el patrón de infiltrado celular en explantes cardíacos de pacientes diagnosticados con CCC y compararlo con otro tipo de cardiomiopatía dilatada utilizando la técnica de citometría de flujo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar el patrón del infiltrado celular en explantes cardíacos de pacientes diagnosticados con cardiomiopatía chagásica crónica, cardiomiopatía dilatada (CDI) y controles sanos con el fin de aunar información útil relacionada con la patogénesis de la enfermedad de Chagas.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar el fenotipo de las células mononucleares del infiltrado inflamatorio del tejido cardíaco de los explantes con CCC, CDI y sanos por citometría de flujo
- Comparar el fenotipo del infiltrado inflamatorio en los explantes con CCC, CDI y sanos
- Correlacionar el patrón de infiltrado celular con la patogénesis de la CCC

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Población de estudio

Para la realización de este trabajo se incluyeron cuatro explantes cardiacos con CCC, cinco con diagnóstico de CDI trasplantados en la Fundación Cardiovascular de Colombia (FCV) Floridablanca-Santander. Siete corazones sanos de pacientes fallecidos sin diagnóstico de alteración cardiaca, sometidos a autopsia médico legal en el Instituto Nacional de Medicina Legal región Nor-Oriente (Bucaramanga) fueron seleccionados como controles.

4.2. Marcadores

Se realizó la selección de marcadores clásicamente descritos en sangre periférica de pacientes con enfermedad de Chagas y de importancia en la patogénesis de acuerdo a datos publicados por diferentes investigadores (Tabla 2).

Tabla 2. Marcadores utilizados para determinar el fenotipo celular. Función y expresión celular.

Molécula	Nombre alternativo	Ligando y moléculas asociadas	Expresión celular	Función
CD3	T3	TCR	Célula T	Complejo de subunidades que media la transducción de señales en células T
CD4	L3T4, w3/25, T4	MHC II, gp 120, IL-6, LcK	Células T, Mo. Mac. Ganulocitos	Activación de células T, diferenciación tímica y receptor para el VIH
CD8	Leu2, T8 Lyt 2,3	MHC I, LcK	Células T Células NK	Correceptor para las moléculas de MHC clase I
CD14	LSP-receptor	Endotoxina, LPS, LTR4, TLR2, LY96	Mo. Mac. Granulocitos	Media la respuesta inmune frente al lipopolisacárido bacterial
CD19	B4	CD21, D81, CD225, Leu-13,Lyn	Células B, Células dendríticas	Se une con el receptor de antígenos de linfocitos B, para disminuir el umbral de estimulación dependiente del receptor de antígeno
CD20	B1, Bp35	Lyn, LCK, Fyn, proteínas de superficie	Células B	Desarrollo y diferenciación de las células B en células plasmáticas

CD25	Tac antigen, IL-2Ra, p55, TCGFR	IL-2	Células T y B, células NK, Mac. Mo.	Receptor de IL-2
CD27	T14, S152, TP 55, TNFRSF7	CD70, TRAF5, TRAF2	Células T y B Células NK	Generación y mantenimiento a largo término de la inmunidad de las células T
CD45	Antígeno común leucocitario (LCA)	P56lck, p59fyn, Src kinase	Células T y B, Células NK, Mo. Mac. Granulocitos	Regulador de la señalización del receptor de antígeno de células T y B, regulador del crecimiento celular y diferenciación
CD45RA	Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC)	P56lck, p59fyn, Src kinase	Células T y B, Células NK, Mo. Mac.	Isoforma de CD45
CD45RO	Protein tyrosine phosphatase receptor type C (PTPRC)	P56lck, p59fyn, Src kinase	Células T y B, Células NK, Mo. Mac. Granulocitos	Isoforma de CD45
CD56	Leu-19, NKH-1, Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)	NCAM-1, Heparin sulfate	Células T, Células NK	Adhesión celular y plasticidad neuronal
CD195	CCR5, CMKBR5, IDDM22, CC-CKR-5, FLJ78003	MIP-1a, 1b, MCP-2, RANTES	Células T, Mo. Mac., Granulocitos	Regula la activación de la quimiotaxis linfocítica durante la migración transendotelial en procesos inflamatorios
CD197	CCR7 (formerly CDw197), BLR2, EB11, CMKBR7	CCL19/ECL, CCL21	Células T y B, Células dendríticas	Activa linfocitos T y B, estimula la maduración de las células dendríticas.
TNFa	TNFSF2 Cachexin, or cachectin	TNFR1 TNFR2	Células T y B, Células NK, Mac.	Proliferación celular, reacción inflamatoria y muerte celular programada
FoxP3	Scurfin	Metal-binding, Zinc	Células T	Modula la expansión y función de células T convencionales

4.3. Obtención de las muestras

A partir de los órganos obtenidos, se tomaron 4 gr de la pared basal posterior del ventrículo izquierdo (Palomino *et al.*, 2000), los cuales fueron fraccionados utilizando cuchillas estériles y sometidos a un proceso de digestión enzimática con la finalidad de recuperar células mononucleares del infiltrado inflamatorio.

4.3.1 Células mononucleares del infiltrado inflamatorio Una vez pesados los fragmentos de tejido cardiaco, estos se depositaron en solución libre de calcio (20 mM Glucosa, 10 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 5 mM, MgSO_4 , 5 mM MOPS, 100 mM NaCl, 50 mM Taurin, pH=7.0 ajustado con 1 M NaOH) a 4°C con el fin de garantizar la viabilidad celular. El tejido fue cortado en pequeños fragmentos ($< 1\text{mm}^3$) utilizando cuchillas estériles, teniendo especial cuidado de remover el tejido graso presente en la muestra. Los fragmentos finamente cortados son transferidos junto con la solución libre de calcio a un vaso de precipitado para ser agitado fuertemente por 3 minutos con la ayuda de una barra de agitación magnética.

Luego de este paso se permitió la decantación del tejido por 10 minutos, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 40 mL de solución libre de calcio suplementado con 1 mg de colagenasa (286 U/mL) (SIGMA-ALDRICH) y 2.5% de penicilina/estreptomicina. La solución fue puesta en agitación por 10 minutos a 37°C.

Transcurrido este tiempo se adicionaron 80 μL de solución de CaCl_2 10 mM, para obtener la concentración final de 20 μM de Ca^{2+} . La suspensión fue nuevamente al agitador por una hora a 37°C.

Finalizada la hora de incubación, la suspensión fue pasada a través de una membrana de nylon de 70 μm a un tubo falcon de 50 mL y con ayuda del émbolo de una jeringa de 3 mL se procedió a hacer fricción mecánica sobre la membrana con el fin de disgregar el tejido que aún permanecía sólido.

La suspensión recolectada es sometida a centrifugación por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque™ (GE Healthcare Bio-Sciences) proporción 3:1. Tras centrifugación a 2000 rpm durante 40 minutos a temperatura ambiente, se recolecta la capa que contiene las células mononucleares, se lavan las células dos veces con PBS centrifugando 10 minutos a 2000 rpm. Finalmente se suspendieron las células en PBS suplementado con SBF al 5% hasta ser adquiridas en el citómetro de flujo.

4.4. Evaluación fenotípica

Para realizar el estudio de marcadores de superficie, se incubaron las células recolectadas con los diferentes anticuerpos monoclonales (Tabla No. 3) en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Todos los anticuerpos están marcados directamente como se describe en la Tabla No. 2. Un volumen final de 100 μ L fue adquirido por panel en el citómetro FACSCanto II (Becton Dickinson) de la FCV. Se emplearon cuatro diferentes paneles de anticuerpos para realizar la caracterización fenotípica de las células mononucleares de acuerdo a los paneles multicolor de la Euroflow (Tabla No. 4).

4.4.1 Evaluación del marcador intracelular FoxP3 por citometría de flujo Para el estudio de FoxP3 se utilizó el kit IntraPrep™ Permeabilization Reagent (BECKMAN COULTER). Brevemente, las células mononucleares recuperadas del tejido fueron incubadas con los marcadores de superficie bajo las condiciones mencionadas anteriormente, luego se fijaron con 40 μ L del reactivo 1 (5% (v/v) formaldehyde), se mezcló vigorosamente con vórtex y se incubó 5 minutos en oscuridad. Luego se agregó 1 mL de buffer de lisis y se incubó nuevamente 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 40 μ L del reactivo 2 (0.1% (w/v) NaN₃), se mezcló con vórtex y se incubó por 5 minutos más. Finalmente se adicionó el marcador intracelular FoxP3 (10 μ L) se mezcló con vórtex y se incubó por 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en los diferentes paneles de caracterización fenotípica

Anticuerpo	Conjugado	Isotipo/ Origen	Clon	Casa Comercial
CD3	FITC	IgG1, κ Mouse	UCHT1	BD
CD3	PerCP	IgG1, λ Mouse	SP34-2	BD

CD3	PE-Cy7	IgG1, κ Mouse	SK7	BD
CD4	V450	IgG1, κ Mouse	RPA-T4	BD
CD4	PerCP	IgG1, κ Mouse	L200	BD
CD8	APC	IgG1, κ Mouse	RPA-T8	BD
CD8	APC-H7	IgG1, κ Mouse(BALB/c)	SK1	BD
CD14	APC-H7	IgG2a, κ Mouse	M5E2	BD
CD19	Pe-Cy7	IgG1, κ Mouse	SJ25C1	BD
CD20	V450	IgG1, κ Mouse(BALB/c)	L7	BD
CD25	PE	IgG1, κ Mouse	M-A251	BD
CD27	FITC	IgG1, κ Mouse(BALB/c)	M-T271	BD
CD27	APC	IgG1, κ Mouse(BALB/c)	M-T271	BD
CD45	V500	IgG1, κ Mouse	HI30	BD
CD45RA	APC	IgG2b, κ Mouse	HI100	BD
CD45RO	PE-C7	IgG2a, κ Mouse(BALB/c)	UCHL1	BD
CD56	PE	IgG1, κ Mouse	B159	BD
CD195 (CCR5)	PE	IgG2a, κ Mouse	2D7/CCR5	BD
CD195 (CCR7)	PE	gG2a, κ Rat	3D12	BD
TNF-α	FITC	IgG1, κ Mouse (BALB/c)	6401.1111	BD
FoxP3	FITC	IgG1, κ Mouse (BALB/c)	236A/E7	BD

Tabla 4. Paneles para la caracterización fenotípica de las células mediante citometría de flujo

Panel	V450	V500	FITC	PE	PercPCy5.5	PeCy7	APC	APCH7	Subpoblaciones celulares
Panel 1	CD20 (5uL)	CD45 (3uL)	CD3 (10uL)	CD56 (10uL)	CD4 (10uL)	CD19 (5uL)	CD8 (5uL)	CD 14 (5uL)	Linfocitos en general
Panel 2	CD4 (5uL)	CD45 (3uL)	CD27 (10uL)	CCR7 (10uL)	CD3 (10uL)	CD45RO (5uL)	CD45RA (10uL)	CD8 (5uL)	Subpoblaciones de Linfocitos T
Panel 3	-	CD45 (3uL)	FOXP3 (5uL)	CD25 (10)	CD4 (10uL)	CD3 (3uL)	CD27 (10uL)	CD8 (5uL)	Linfocitos T reguladores
Panel 4	-	CD45 (3uL)	FNT α (10uL)	CCR5 (10uL)	CD4 (10uL)	CD3 (3uL)	-	CD8 (5uL)	Liberación de citocinas

4.5. Análisis histológico

Para el estudio histológico, un fragmento de la pared basal posterior del ventrículo izquierdo fue fijado en formol al 10%, los fragmentos fueron procesados automáticamente (tissue TEK-II), sumergidos en parafina formando un bloque y sometidos a cortes seriados (3-5 micras) y se colorearon con Hematoxilina-Eosina (HE). El procedimiento fue realizado en el Departamento de Patología de la Universidad Industrial de Santander. El estudio histológico fue realizado con la supervisión del patólogo de dicho Departamento.

4.6. Análisis de las muestras

Las muestras fueron analizadas con el software INFINICYT (Cytognos SL Salamanca Spain), tras la exportación de los ficheros “.fcs” (Figura No. 5).

4.7. Método estadístico

La comparación de las poblaciones celulares presentes en cada grupo de estudio se llevó a cabo mediante t-test. Para la realización de estos análisis se utilizó el programa estadístico STATA 12.1.

4.8. Aspectos éticos

El presente trabajo de investigación se encuentra anidado dentro del macroproyecto titulado: “Expresión diferencial en el miocardio de pacientes con Cardiomiopatía Chagásica Crónica: una aproximación desde la proteómica e histopatología”. De conformidad con el artículo 11 de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de salud de la República de Colombia, las actividades que se desarrollaron en este trabajo, pertenecen a la categoría de investigación con riesgo mínimo.

Los procedimientos relacionados con la práctica de laboratorio se realizaron cumpliendo lo estipulado en la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia, por medio de la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; específicamente lo relacionado en el capítulo VI del Título II, para investigaciones en órganos, tejidos y sus derivados, productos y cadáveres de seres humanos.

Los explantes cardíacos en el estudio fueron tomados con autorización previa del paciente y la firma del consentimiento informado y en el caso de órganos obtenidos de personas fallecidas, mediante la firma del consentimiento informado por parte de algún familiar. Este documento fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS), en la reunión con acta número 21 llevada a cabo el 29 de agosto de 2014. Los datos obtenidos a partir de este estudio se emplearon únicamente con fines investigativos, y la confidencialidad de los datos se mantuvo de acuerdo al artículo 8 de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud.

Los datos se manejaron según lo indica la ley estatutaria No. 1581 del 2012 del Congreso de Colombia, el decreto 1377 del 2013 de la Presidencia de la República de Colombia y la resolución 1227 de 2013 de la Rectoría de la Universidad Industrial de Santander sobre protección de datos personales, garantizando de esta forma la protección de los datos personales de quienes participaron en la investigación.

La disposición final de los residuos generados en la investigación, se realizó siguiendo lo establecido en el Decreto 351 de 2014 de la Presidencia de la República de Colombia, por medio del cual se reglamenta la gestión integral de los residuos generados en la atención en salud y otras actividades. Igualmente se acató lo dispuesto en el Plan de Gestión Integral de Residuos (PGIR) de la UIS atendiendo en ambos casos a lo estipulado para residuos biosanitarios, anatomopatológicos y cortopunzantes.

5. RESULTADOS

5.1. Análisis de la población de estudio

La población de estudio estuvo conformada por 16 individuos. El 31,25% fueron mujeres y 68,75% hombres. Los pacientes con ECh presentaron una edad promedio superior a los pacientes con CDI, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.25$) (Tabla 5).

Tabla 5. Descripción de los sujetos de estudio

	Paciente	Diagnóstico	Sexo	Edad	Edad Promedio \pm DS
CCC (N= 4)	ExCh-01	CCC	M	46	44 \pm 8,01
	ExCh-02	CCC	M	31	
	ExCh-03	CCC	F	53	
	ExCh-04	CCC	M	46	
CDI (N=5)	ExNCh-05	CD	F	53	32,8 \pm 14,24
	ExNCh-06	CD	M	24	
	ExNCh-07	CD	F	20	
	ExNCh-08	CD	M	47	
	ExNCh-09	CD	F	20	
Sanos (N=7)	ExSN-10	SN	F	20	27,7 \pm 5,6
	ExSN-11	SN	M	19	
	ExSN-12	SN	M	26	
	ExSN-13	SN	M	33	
	ExSN-14	SN	M	33	
	ExSN-15	SN	M	33	
	ExSN-16	SN	M	30	

5.2. Caracterización fenotípica del infiltrado inflamatorio en pacientes con ECh

La caracterización del infiltrado de corazones provenientes de pacientes con ECh mostró predominancia de linfocitos T ($\mu=81,97\%$), escasos linfocitos B ($\mu=2,05\%$) y un porcentaje considerable de monocitos ($\mu=13,8\%$) (Tabla 6). El porcentaje de linfocitos T (LT) con fenotipo citotóxico ($CD3^+CD8^+$, $\mu=63,6\%$) fue superior que el de células T con fenotipo cooperador ($CD3^+CD4^+$, $\mu=34,8\%$) con diferencia

estadísticamente significativa ($p=0.003$). Se encontró un mayor porcentaje de los linfocitos doble negativos ($\mu=1,15\%$) en comparación con los doble positivos ($\mu=0,35\%$), sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.52$).

El análisis de subpoblaciones de LT mostró menor porcentaje de células $CD4^+CD45RA^+$ comparado con la población $CD8^+CD45RA^+$, sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.22$) (Figura No. 5). En cuanto a los LT de memoria, la media de la población $CD8^+CD45RO^+$ fue significativamente menor que $CD4^+CD45RO^+$ ($p=0.03$). De igual forma se observaron diferencias significativas en la media de los linfocitos $CD4^+CD45RA^+CD45RO^+$ la cual fue superior a la población $CD8^+CD45RA^+CD45RO^+$ ($p=0,005$). La media de células T reguladoras ($FOXP3^+CD25^+$) fue de 2,2% y el promedio de células $CCR5^+$ fue de 9,4% (Tabla 6).

Tabla 6. Caracterización fenotípica del infiltrado en explantes de pacientes con ECh

1. Células mononucleares

ExCh	Linfocitos	Linfocitos	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁻ CD8 ⁻	Linfocitos	Monocitos
		T					B	
01	76,99	76,99	38,43	55,92	1,32	4,31	3,27	23,01
02	79,39	65,48	40,68	59,09	0,1	0	1,11	20,61
03	95,01	97,06	22,75	76,96	0	0,29	2,94	4,99
04	93,09	88,35	37,41	62,59	0	0	0,9	6,91
Media	86,12	81,97	34,81	63,64	0,35	1,15	2,05	13,88

2. Subpoblaciones de Linfocitos T

ExCh	CD4 ⁺	CD27 ⁺	CD45RA ⁺	CD45RO ⁺	CD45RA/ CD45RO	CD8 ⁺	CD27 ⁺	CD45 RA ⁺	CD45 RO ⁺	CD45RA/ CD45RO ⁺
01	36,5	0,05	0,4	99,1	0	54,9	0,15	37,18	46,72	15,13
02	29,8	0	16,98	78,43	3,22	60,72	0	38,22	36,48	24,85
03	32,4	0	21,99	64,24	8,38	67,56	0	17,81	63,07	16,14
04	44,4	0	5,69	82,94	8,83	55,61	0	3,94	76,29	17,62
Media	35,8	0,01	11,3	81,2	5,1	59,7	0,03	24,3	55,6	18,4

3. Linfocitos T reguladores

ExCh	CD4 ⁺	CD27 ⁺	Treg	CD8 ⁺	CD27 ⁺	CCR5 ⁺
01	41,84	45,74	4,11	49,05	12,58	8,19
02	36,06	38,34	3,2	49,64	35,96	7,14
03	24,24	59,03	1,6	75,76	51,49	15,9
04	43,44	49,27	0	56,56	51,96	6,21
Media	36,4	48,1	2,22	57,8	37,99	9,36

5.3. Caracterización fenotípica del infiltrado inflamatorio en pacientes con CDI

El infiltrado inflamatorio de los explantes de pacientes con CDI mostró un 93,9% linfocitos T, 1,8% linfocitos B, 10,7% monocitos y 3,9% células NK. La distribución de la subpoblación de linfocitos T con fenotipo cooperador mostró un 15,6% de

células CD45RA⁺; 62,7% CD45RO⁺ y 21,7% CD45RA⁺CD45RO⁺. En cuanto a las células CD8⁺ se observó 31,7% CD45RA⁺, 29% CD45RO⁺ y 39,2% CD45RA⁺CD45RO⁺ (Tabla 7). La media de las células CD4⁺ fue significativamente mayor que las CD8⁺ ($p=0,0001$). La población CD4⁺CD45RA⁺ fue significativamente menor que las células con fenotipo CD8⁺CD45RA⁺ ($p=0,009$). La media de las células CD4⁺CD45RO⁺ fue superior a CD8⁺CD45RO⁺ ($p=0,003$). El promedio de la población CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺ fue menor que CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁺ ($p=0,05$). No se detectaron células T reguladoras.

Tabla 7. Caracterización fenotípica del infiltrado en explantes de pacientes con CDI

1. Células mononucleares

CD	Linfocitos	Linfocitos T	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁻	Linfocitos B	Monocitos	NK
01	99,9	98,03	61,77	33,83	0	4,4	0,49	0	1,48
02	97,5	96,29	61,53	38,47	0	0	1,39	0	1,2
03	89,4	94,32	63,25	36,75	0	0	3,01	10,6	2,67
04	86,6	90,26	59,22	40,78	0	0	3,46	13,42	6,28
05	70,5	91,07	77,25	22,75	0	0	0,98	29,46	7,95
Media	88,8	93,9	64,6	34,5	0	0,88	1,8	10,7	3,9

2. Subpoblaciones de Linfocitos T

CD	CD4 ⁺	CD27 ⁺	CD45RA ⁺	CD45RO ⁺	CD45RA/ CD45RO	CD8 ⁺	CD27 ⁺	CD45 RA ⁺	CD45 RO ⁺	CD45RA/ CD45RO
01	68,8	25,04	4,75	67,92	27,33	31,12	0	26,15	23,85	50
02	60,1	0	20,42	50,38	29,2	39,85	0	35,2	40,88	23,92
03	64,7	9,5	17,44	64,91	17,65	35,24	0	29,55	32,76	37,69
04	61,6	0	23,78	70,02	6,2	38,34	0	27,66	21,96	50,38
05	70,4	18,32	11,47	60,49	28,4	29,51	0	40,32	25,67	34,01
Media	65,2	10,6	15,6	62,7	21,7	34,8	0	31,8	29,02	39,2

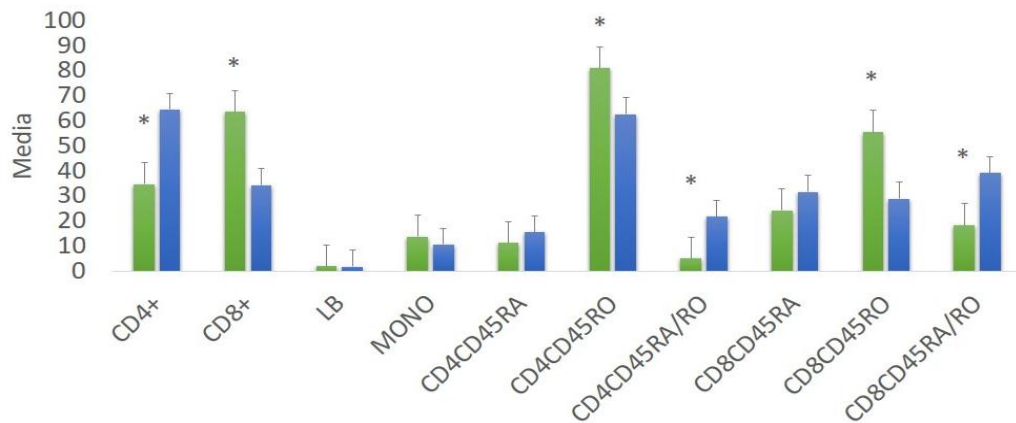
5.4. Infiltrado inflamatorio en sujetos sanos

En los tejidos provenientes de sujetos sanos la celularidad recuperada fue muy baja. Se identificaron linfocitos T CD4⁺ y macrófagos, los cuales corresponden a células propias del tejido.

5.5. Fenotipo celular CCC vs CDI

Al comparar el infiltrado inflamatorio de explantes de pacientes con CCC y CDI se encontraron diferencias significativas en la media de los linfocitos (Figura 6). El promedio de células CD4⁺ fue menor en los pacientes con CCC (34,8% vs 64,6%) ($p=0,0003$), mientras que la media de células CD8⁺ fue superior en este grupo (63,6% vs 34,5%) ($p=0,0005$). La población CD4⁺CD45RO⁺ fue mayor en el infiltrado de pacientes con ECh (81,2% vs 62,7%) ($p=0,02$), mientras que las células CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺ se evidenciaron en menor porcentaje (5,1% vs 21,7%) ($p=0,02$). Este mismo comportamiento se observó para la subpoblación CD8⁺, siendo superior la media de las células CD8⁺CD45RO⁺ (55,5% vs 29,02%) ($p=0,009$) y menor la población CD8⁺CD45RA⁺CD45RO⁺ en los explantes provenientes de pacientes de con ECh (18,4% vs 39,2%) ($p=0,005$) (Figura 6). No se observaron diferencias significativas para las demás poblaciones celulares analizadas.

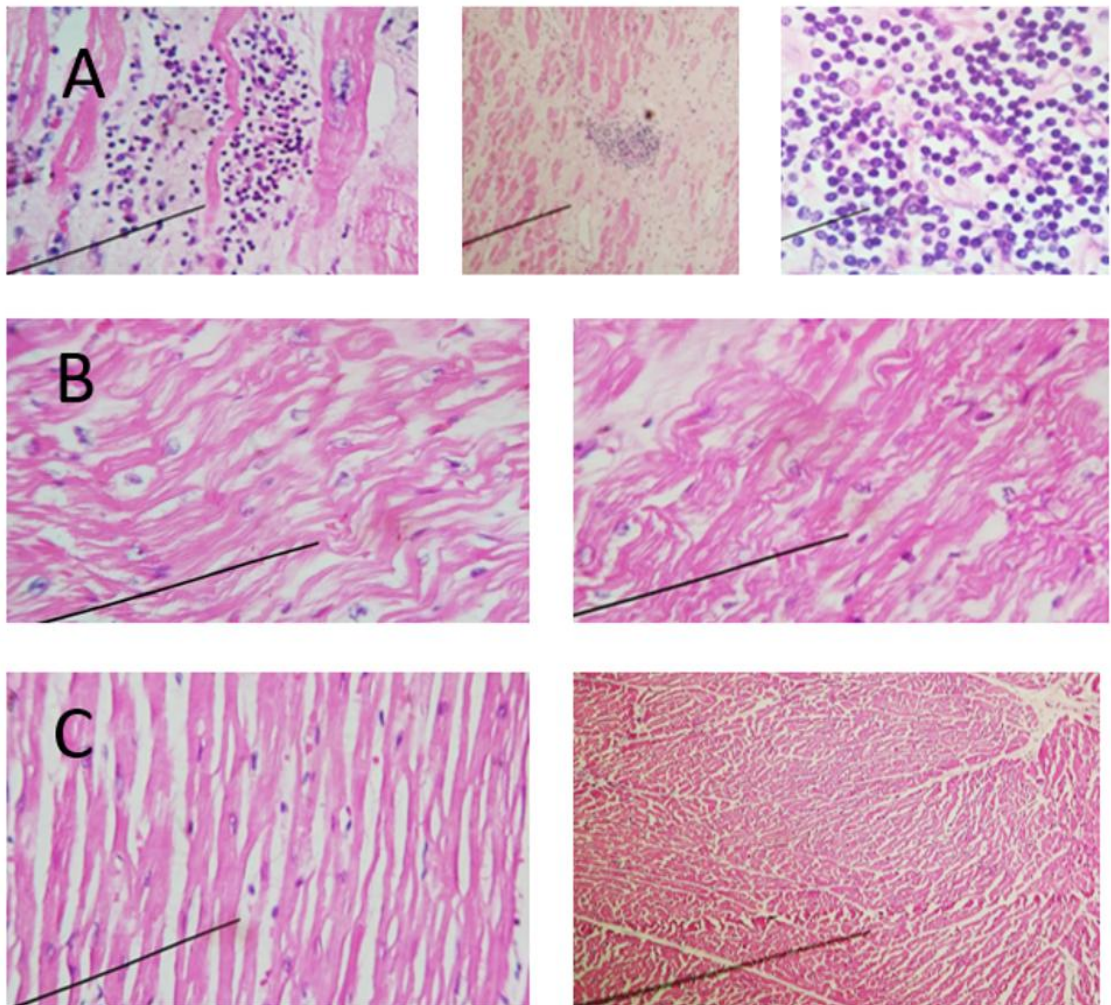
Figura 6. Infiltrado inflamatorio de corazones con CCC vs CDI. En verde porcentaje de células infiltrantes en explantes cardiacos con CCC y en azul CDI. (* $p<0,05$).



5.6. Análisis histopatológico

Los explantes provenientes de pacientes con CCC mostraron abundante infiltrado inflamatorio de células mononucleares y destrucción masiva de cardiomiocitos así como presencia de fibrosis intersticial en ausencia de nidos de amastigotes (Figura 7A). En las muestras de sujetos con CDI se observó daño estructural en las fibras cardiacas con intensa fibrosis intersticial y escaso infiltrado inflamatorio (Figura 7B). En individuos sanos se evidencio el tejido saludable con la debida conservación de su estructura y ausencia de células inflamatorias (Figura 7C).

Figura 7. Histopatología de la pared posterior del ventrículo izquierdo de explantes cardiacos con CCC (A), CDI (B) y controles (C). Tinción con Hematoxilina-Eosina.



6. DISCUSIÓN

La infección con *T. cruzi* induce la activación de la respuesta inmune a nivel del miocardio que si bien es indispensable para la eliminación del parásito puede generar daño tisular. Nuestros resultados demuestran que el infiltrado inflamatorio en corazones de pacientes con ECh se compone principalmente de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo de células de memoria, células CD4⁺, monocitos y escasos linfocitos B. Estos hallazgos son coherentes con lo reportado en sangre periférica de pacientes con ECh. La interacción de estos fenotipos celulares y su actividad efectora en el miocardio probablemente impacte de forma negativa durante la fase crónica de la enfermedad perpetuando la respuesta inmune y causando daño irreparable en un tejido que presenta baja tasa de regeneración.

En primer lugar el mayor porcentaje de linfocitos T encontrados en el infiltrado de pacientes con ECh corresponde a LT CD8⁺ (63%), que son cruciales para controlar la infección por *T. cruzi* lo cual se ha evidenciado en múltiples estudios que demuestran la incapacidad de sobrevivir a la infección en ratones deficientes de CD8⁺ (Martin & Tarleton, 2004). Sin embargo, pese a una buena respuesta la infección raramente se resuelve en animales infectados experimentalmente y los antígenos residuales del parásito perpetúan el proceso inmune. En todos los casos estudiados la persistencia de *T. cruzi* es el principal hallazgo en tejido muscular y explica el desarrollo de miocarditis (Tarleton, 2015). De esta manera la presencia de LT CD8⁺ en sitios de persistencia del parásito ha sido interpretada, tanto como una señal de una respuesta inmune adecuada para contener la infección como un componente para perpetuar el daño en el tejido y la enfermedad. Aunque probablemente los dos puntos sean ciertos, es claro que la respuesta CD8⁺ es necesaria en el control de la infección y su contribución a la enfermedad podría ser consecuencia de su función de contención (Padilla *et al.*, 2009). Diferentes estudios respaldan el papel de este fenotipo celular en el daño cardiaco debido a que estas células constituyen la principal fuente de agentes cardiopatogénicos (Caballero *et al.*, 2017). Por ejemplo, se ha reportado la presencia de células T CD8⁺ que expresan marcadores de citotoxicidad como granzima A en el infiltrado inflamatorio

de cardiomiocitos en pacientes con Chagas crónico, dicha expresión puede ser importante en el daño al tejido (Reis *et al.*, 1993). Por otra parte, Lasso *et al* observaron cantidades aumentadas de INF γ en pacientes con alteraciones del ECG (Lasso *et al.*, 2015), dicho incremento podría conducir a una mayor actividad citolítica de LT CD8 $^{+}$. Además, la expresión de MHC-I inducida en miocitos por INF γ incrementa la oportunidad de los LT CD8 $^{+}$ para reconocer antígenos que están siendo expresados por los cardiomiocitos infectados (Ortega *et al.*, 2017). La producción de INF γ se correlacionó positivamente con la presencia de falla cardiaca. La persistencia de esta citoquina involucrada en el control del parásito junto con el ON inducirían mecanismos de daño tisular que contribuyen al desarrollo de falla cardiaca (Rodrigues *et al.*, 2012). De igual forma en caninos infectados con *T. cruzi* se ha observado un incremento en las células T productoras de INF γ lo que sugiere un estado general de activación (Hartley *et al.*, 2014). Asimismo las células CD8 $^{+}$ son las principales productoras de CCL5 y MMP-2, dos mediadores implicados en inflamación y fibrosis cardiaca, factores que determinan la severidad de la cardiomiopatía chagásica (Caballero *et al* 2017). Las células CD8 $^{+}$ han sido identificadas como el principal origen celular de MMP-2 y MMP-9 en pacientes infectados con *T. cruzi* que presentan falla cardiaca (Fares *et al* 2013). MMP-2 ha sido implicada en la transición de hipertrofia a falla cardiaca y MMP-9 se asocia a activación de vías apoptóticas del miocito (Polyakova *et al* 2004 Bironaite *et al* 2015). Una elevada activación de estas metaloproteinasas podría estar potenciando el influjo de células inflamatorias al tejido infectado a través de la activación de quimoquinas o la degradación de componentes de matriz del miocardio lo cual facilita los cambios profibróticos (Caballero *et al* 2017).

Ahora bien la caracterización de las células CD8 $^{+}$ en los explantes de pacientes con CCC demostró un alto porcentaje de células de memoria CD8 $^{+}$ CD45RO $^{+}$ (56%), menor proporción de linfocitos T vírgenes CD8 $^{+}$ CD45RA $^{+}$ (24,3%) y un porcentaje considerable (18%) de células en transición CD45RA $^{+}$ CD45RO $^{+}$. Resultados similares fueron obtenidos en el estudio del infiltrado inflamatorio en corazones de pacientes con Chagas crónico mediante inmunohistoquímica (Arguello *et al.*, 2014). En este caso se observó un alto porcentaje (>30%) de células CD45RO $^{+}$ las cuales

se agregan alrededor del cardiomiocito infectado. Sin embargo, contrario a nuestros hallazgos la expresión de CD27 fue más alta en pacientes con miocarditis severa que en pacientes con bajo grado de inflamación. Esta diferencia podría deberse al diseño metodológico y analítico, puesto que los autores evalúan el marcador como el porcentaje de células CD27⁺ en el total de células mononucleares, sin realizar distinción del subtipo celular. Sin embargo, este fenotipo CD45RA⁻CD27⁻ si está acorde con los datos obtenidos en estudios de sangre periférica donde la proporción de este tipo de células de memoria diferenciadas completamente fue observado en altos porcentajes en pacientes con la forma severa de la enfermedad (Albareda *et al.*, 2013 Lasso *et al.*, 2015). Este fenotipo de células CD8⁺ presentan alteraciones en la producción de citoquinas y co-expresan receptores inhibitorios a medida que la enfermedad se hace más severa. Además su actividad citotóxica medida por la liberación de gránulos que contienen perforina y granzima fue más alta en los pacientes con las formas más graves de la enfermedad cardiaca (Lasso *et al* 2015). Estas células productoras de perforina jugarían un papel detrimental en la infección experimental de ratones con *T. cruzi* conduciendo a daño cardiaco (Silverio *et al* 2010). En este mismo sentido Mateus y colaboradores *et al.*, encontraron un alto porcentaje de células T de memoria efectora terminal (T_{TE}) en pacientes con enfermedad severa y baja frecuencia de células polifuncionales. Estas células T_{TE} presentan mayor capacidad citotóxica y estarían asociadas con daño cardiaco debido a la alta frecuencia de células productoras de perforina observada en los pacientes con CCC (Mateus *et al.*, 2015). De esta manera la presencia de células CD8⁺ de memoria con alto grado de diferenciación y en estado de transición refleja una respuesta activa frente a antígenos del parásito y apoya la hipótesis del mantenimiento de la inflamación crónica en nuestro estudio. Por otra parte se ha descrito que estas células totalmente diferenciadas son disfuncionales y producen bajas cantidades de INF γ presentando un fenotipo exhausto con disminución de la capacidad citotóxica (Ripoll *et al* 2017). Sin embargo investigaciones recientes demuestran que dichas células no expresan marcadores de fenotipo exhausto como PD-1 y su funcionalidad es importante para controlar el parásito a lo largo de la infección (Pack *et al* no publicado). Por otra parte, aunque se ha sugerido que las

células CD8⁺ presentan inmunodominancia para epítopes de transialidasas de *T. cruzi* lo cual limitaría la eficiencia en la eliminación del parásito, los estudios indican que la calidad, frecuencia o fenotipo de las células T con alta inmunodominancia no siempre representa una medida de la calidad general del control inmune (Rosenberg *et al.*, 2016). De esta manera en nuestra población probablemente este fenotipo celular es funcional en la eliminación de *T. cruzi* debido a que el parásito no se observa en el tejido, pero produce daño tisular como consecuencia de su actividad efectora.

En segundo lugar, el porcentaje de LT CD4⁺ fue ~35% de los cuales la mayoría corresponde a células de memoria CD4⁺CD45RO⁺ (81,2%) que podrían asociarse a daño en el tejido a través de la producción de moléculas citotóxicas. Además de las funciones reguladoras y efectoras, las células CD4⁺ también están involucradas en la lisis del parásito y pueden participar en el control de la infección (Keesen *et al.*, 2012). Araújo y colaboradores encontraron que los pacientes crónicos con ECh tienen mayor número de células CD4⁺CD45RO⁺ secretoras de INF γ en sangre periférica (Araújo *et al.*, 2009). Asimismo se ha reportado que las células CD4⁺ exhiben un fenotipo monofuncional enriquecido por células T que sólo producen INF γ (Albareda *et al.* 2013). Es probable que este fenómeno también ocurra a nivel del tejido y la producción no regulada de INF γ promueva la destrucción del miocardio debido a sus efectos citotóxicos. También se ha demostrado que las células T están sobre-activadas en pacientes con CCC y el porcentaje de células CD4⁺/HLA-DR⁺ se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Giraldo *et al.*, 2013). La alta proporción de células T de memoria presentes en los explantes de pacientes con CCC demuestra que existe una respuesta potente a los antígenos remanentes del parásito. La baja expresión de CD27 lleva a pensar que posiblemente se trate de células T de memoria efectora que poseen una alta actividad citolítica con producción de INF γ y TNF α , lo cual favorece el desarrollo de daño tisular.

En el mismo sentido, nuestros resultados demostraron un alto porcentaje de células que expresan CCR5⁺ (μ =9,8%) que podrían favorecer la inflamación en el tejido de

los pacientes con ECh. Teniendo en cuenta que CCR5 es necesario para inducir una fuerte respuesta Th1, el incremento en la expresión de CCR5 en el tejido cardiaco conduce a amplificar la migración de células T al miocardio y el incremento en la producción de TNF α (Machado *et al.*, 2005). Además, se ha encontrado asociación entre las células productoras de TNF α y la presencia de falla cardiaca por la inducción de TNF α en la síntesis de colágeno y consecuente fibrosis. En este sentido, la pérdida de contractilidad celular y su reemplazo por tejido fibrótico contribuye a la falla cardiaca. El TNF α es la citoquina más secretada entre las diferentes subpoblaciones de células T en pacientes con Chagas crónico y se asocia con daño cardiaco, progresión de la inflamación y muerte celular (Ripoll *et al* 2017).

En tercer lugar, el infiltrado inflamatorio de pacientes con ECh mostró un bajo porcentaje de células T reguladoras (Treg) (2,2%) tal como se ha descrito en estudios realizados en sangre periférica. La escasa población encontrada indica un desbalance en la respuesta inmune favoreciendo el perfil pro-inflamatorio. Las células Treg se han descrito como elementos claves en la regulación de la respuesta inmune dado que previenen el desarrollo de patología inmune inducida por la infección. De esta manera limitan el daño en el tejido asociado a una respuesta vigorosa frente al parásito (de Araújo *et al.*, 2011). En consecuencia el bajo porcentaje observado en nuestra población impacta de manera negativa y permite el establecimiento de una respuesta exacerbada. Estudios en células de sangre periférica han demostrado una alta frecuencia de células Treg en estado activado que podrían limitar la fuerte actividad citotóxica y daño al tejido. De igual forma la presencia de estas células en los pacientes indeterminados se correlaciona de forma positiva con el mantenimiento de una mejor función cardiaca. Se encontró que los pacientes indeterminados tienen un incremento de células CD4⁺FoxP3⁺CD25^{HIGH} comparado con pacientes con CCC y presentaron características funcionales compatibles con fenotipo regulador (de Araújo *et al.*, 2012). Se ha observado que los pacientes con la forma indeterminada tienen altos porcentajes de células CD4⁺CD25^{HIGH}FoxP3 secretoras de IL-10 y que expresan granzima. Este tipo de respuesta inmune limitaría el daño al tejido en los pacientes asintomáticos (de Moura, 2014).

En cuanto a la presencia de células doble negativas (DN) CD4⁺CD8⁻ se estableció un porcentaje considerable en un explante cardiaco de paciente con ECh (~5%). Se ha descrito que el fenotipo DN produce citoquinas pro-inflamatorias, así que podrían aportar al establecimiento de miocarditis. Las células DN son fuente importante de citoquinas inflamatorias y anti-inflamatorias en pacientes con CCC y la forma indeterminada de la ECh respectivamente (Passos *et al.*, 2016). Passos y colaboradores observaron que la estimulación con el parásito incrementa la expresión de CD1a, b, c y d. La expresión de CD1d mostró asociación con la activación de DN así como con una peor función ventricular en pacientes con ECh. El bloqueo de CD1d condujo a una clara reducción de la activación de células DN y a una disminución en la expresión de INF γ ; este bloqueo cambia la expresión hacia un perfil menos inflamatorio en pacientes cardiacos (Passos *et al.*, 2016). Estudios han demostrado que las subpoblaciones de linfocitos T DN se expanden durante la fase crónica de la ECh y pueden mostrar una exuberante producción de citoquinas (Villani *et al.*, 2010. Dutra *et al.*, 2014) al menos en sangre periférica. Estos datos soportan que la presencia de células DN en miocardio aun en baja proporción, podrían favorecer el mantenimiento de inflamación crónica. Por otra parte, se encontró una mínima proporción de células DP (~1%) en pacientes con ECh que también podrían producir daño en el tejido a través de la producción de moléculas citotóxicas. Giraldo y colaboradores describieron que las células T DP en sangre periférica muestran fenotipo de memoria CD45RO⁺ y son más diferenciadas, basados en una baja expresión de CD27 y frecuente producción de perforina o granzima B. El porcentaje de estas células fue alto en pacientes con ECh crónica, con aumento en la expresión de marcadores de activación en estas células (Giraldo *et al.*, 2011). Adicionalmente, las células DP pueden reconocer epítopes de *T. cruzi* debido a que tienen fenotipo de memoria y se ha sugerido que podrían migrar al tejido donde persiste el parásito y contribuir a la patología. Giraldo y colaboradores demostraron una mayor expresión de perforina en células DP de sangre periférica en los pacientes con ECh con un incremento en la degranulación en los sujetos sintomáticos. Estos datos soportan la afirmación de que el porcentaje de células DN

y DP encontrado puede tener cierto efecto en favorecer la inflamación y contribuir al daño cardíaco.

Otro componente importante del infiltrado inflamatorio en nuestro estudio de explantes con CCC y CDI son los macrófagos (14% y 11% respectivamente). Los macrófagos representan la primera línea de defensa contra patógenos y coordinan los mecanismos de reparación del tejido para preservar la homeóstasis. Se han descrito dos fenotipos de macrófagos, M1 activados por citoquinas Th1 (INF γ e IL-12) con mayor capacidad microbicida y producción de citoquinas inflamatorias y macrófagos M2 activados por mediadores anti-inflamatorios (Ponce *et al.*, 2016). Ahora bien, el principal desorden arritmogénico en la CCC son las lesiones fibróticas y necróticas causadas por reacciones inflamatorias en el miocardio. El porcentaje de macrófagos encontrado podría favorecer este proceso debido a que estas células propagan la respuesta Th1 por liberación de citoquinas proinflamatorias y más tarde causan daño al tejido por liberación de óxido nítrico. También podrían estar participando en la activación de células T citotóxicas que promuevan el daño muscular a través de un proceso mediado por perforina. Por otra parte, De Freitas y colaboradores encontraron que los macrófagos expresan Gal-3 en muestras de corazón de pacientes con CCC y demostraron que la infección por *T. cruzi* incrementa la expresión de Gal-3 la cual favorece la síntesis de colágeno Tipo I y por ende la fibrosis (De Freitas Souza, 2017). Es posible que los macrófagos presentes en el infiltrado de pacientes con ECh expresen marcadores como Gal-3 y presenten un fenotipo M1 con producción de citoquinas inflamatorias que conduzcan al mantenimiento de miocarditis y desarrollo de fibrosis. Nuestro estudio demostró extensas zonas de fibrosis en la pared del ventrículo izquierdo de explantes con CCC, lo cual podría ser el resultado de la acción de los macrófagos observados en el infiltrado.

Un bajo porcentaje de linfocitos B se encontró en pacientes con CCC y CDI. El papel de estas células ha sido relacionado con la producción de anticuerpos dirigidos contra el miocardio y por ende daño cardíaco. Guo y colaboradores encontraron que los pacientes con cardiomiopatía dilatada presentan un alto porcentaje de células B

productoras de IL-10 que tendrían la capacidad de mantener la homeóstasis inmune (Guo *et al.*, 2015). De esta manera teniendo en cuenta la intensidad de la miocarditis en CCC vs CDI, es posible que estas células productoras de IL-10 en los pacientes con CDI mantengan limitada la respuesta inmune y por ende muestren menor infiltrado inflamatorio. Por el contrario, en los pacientes con CCC los linfocitos B posiblemente estén sesgados a la producción de citoquinas y anticuerpos inducida por el mismo ambiente pro-inflamatorio presente en la CCC y de esta manera favorezcan la producción de fibrosis e hipertrofia del cardiomiocito.

En cuanto al infiltrado observado en pacientes con CDI se encontró mayor proporción de células CD4⁺ similar a lo reportado previamente por Arguello y colaboradores quienes en explantes de pacientes con miocarditis de células gigantes (idiopática) observaron predominio de macrófagos, células dendríticas y células T CD4⁺ con intensa miocarditis y daño multifocal en el cardiomiocito (Arguello *et al.*, 2014). A diferencia de estos hallazgos, nuestra población de estudio mostró moderada miocarditis y presencia de linfocitos B y monocitos. Las células NK sólo se detectaron en bajo porcentaje en pacientes con CDI (4%). La cardiomiopatía inflamatoria e idiopática se caracteriza por bajos niveles de NK lo que indica que puede haber defectos en su frecuencia y función. Las células NK se consideran protectoras en la patogénesis de la miocarditis en modelo murino dado que pueden limitar la acumulación de eosinófilos, inducir la lisis de células T auto-agresivas y acelerar la maduración de monocitos (Ong *et al.*, 2016). Además tienen la capacidad de limitar la acumulación de colágeno e inducir la lisis de fibroblastos activados lo que bloquea la generación de fibrosis (Muhanna *et al.*, 2011). Aunque el porcentaje de células NK encontrado en explantes con CDI fue pequeño, probablemente su presencia impacte de manera positiva limitando la miocarditis y previniendo el desarrollo de fibrosis.

Las diferencias encontradas entre el fenotipo celular presente en CDI y CCC demuestra que la inmunoregulación es diferente entre miocarditis infecciosa y no infecciosa. El infiltrado en pacientes con CDI se caracteriza por una menor cantidad y proporción de células T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria que en ausencia de antígenos

de origen infeccioso favorecen una regulación inmune efectiva que limita la miocarditis. Por el contrario el miocardio de pacientes con CCC se encuentra altamente infiltrado por células T de memoria y macrófagos, con baja expresión de células Treg inclinando la respuesta hacia un perfil pro-inflamatorio.

Nuestros resultados demuestran que la presencia e interacción de células TCD8⁺, TCD4⁺, macrófagos y LB en diferentes proporciones en el miocardio, conducen al desarrollo y mantenimiento de una falla cardiaca severa en los pacientes con CCC, producto de la liberación de moléculas citotóxicas que activan vías implicadas en daño cardiaco.

Los datos obtenidos dentro de cada grupo presentaron una distribución normal (Test de Shapiro-Wilk >0.05). No se observaron diferencias significativas intra-grupo lo que respalda la homogeneidad de los datos encontrados.

La principal limitante del presente estudio fue el uso de un mínimo número de marcadores que limitó la identificación de otros fenotipos y la producción de otras proteínas. Asimismo se recolectó un pequeño tamaño de muestra, el cual fue dependiente de la tasa de trasplante de corazón que se realiza en el departamento de Santander y que lamentablemente disminuyó en los años en los que se adelantó el trabajo. Otro aspecto a tener en cuenta en la metodología es el uso de digestión enzimática agresiva requerida para obtener células libres de uno de los tejidos más compactos del cuerpo. Esta digestión pudo generar daño a nivel de los receptores celulares y dificultar el hallazgo de los marcadores que no pudieron determinarse. De igual forma el tiempo transcurrido desde la toma de muestra hasta el procesamiento de la misma para cada uno de los explantes pudo afectar la recuperación de los diferentes fenotipos celulares.

7. CONCLUSION

El infiltrado inflamatorio presente en los explantes de pacientes con CCC favorece la respuesta pro-inflamatoria en el tejido cardiaco mediante la actividad citotóxica de las células T CD8⁺ de memoria y un número reducido de células Treg. La capacidad de *T. cruzi* para mantener una infección persistente por décadas, activa de manera constante la interacción de LT CD8⁺, LT CD4⁺ y macrófagos que mediante sus funciones efectoras producen daño tisular e inflamación crónica. Por el contrario el infiltrado en explantes de pacientes con CDI presenta una menor proporción de LT de memoria y miocarditis moderada producto de un balance adecuado entre regulación negativa y respuesta pro-inflamatoria.

8. RECOMENDACIONES

Incluir marcadores relacionados con citotoxicidad como Granzima B, Perforina 1, Granulosina, KIR3DS1, KIR2DL14, KLRC2.

Ampliar el número de explantes para mejorar el poder de las asociaciones encontradas.

Realizar de forma simultánea la fenotipificación de tejido y sangre periférica para llevar a cabo un test de correlación estadística que permita evaluar la utilidad del estudio en células de sangre periférica. Esto permitirá establecer un perfil de marcadores de progresión a tener en cuenta para el diseño de blancos terapéuticos.

BIBLIOGRAFÍA

ABEL, Lúcia, *et al.* Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Autoimmunity*, 2001, vol. 17, no 1, p. 99-107.

ACQUATELLA, Harry. Echocardiography in Chagas heart disease. *Circulation*, 2007, vol. 115, no 9, p. 1124-1131.

AFANASYEVA, Marina, *et al.* Quantitative analysis of myocardial inflammation by flow cytometry in murine autoimmune myocarditis: correlation with cardiac function. *The American Journal of Pathology*, 2004, vol. 164, no 3, p. 807-815.

ALBAREDA, María, *et al.* *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *International Immunology*, 2006, vol. 18, no 3, p. 465-471.

ALBAREDA, María, *et al.* Polyfunctional T cell responses in children in early stages of chronic *Trypanosoma cruzi* infection contrast with monofunctional responses of long-term infected adults. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2013, vol. 7, no 12, p. e2575.

ANDRADE, Luciana, ANDREWS, Norma. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, vol. 3, no 10, p. 819-823.

ANDRADE, Sonia, *et al.* Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1991, vol. 86, no 2, p. 187-200.

ARAUJO, Jorge, *et al.* An Fc gamma RII-, Fc gamma RIII-specific monoclonal antibody (2.4 G2) decreases acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infection and Immunity*, 1993, vol. 61, no 11, p. 4925-4928.

ARGÜELLO, Rafael, *et al.* Presence of antigen-experienced T cells with low grade of differentiation and proliferative potential in chronic Chagas disease myocarditis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014, vol. 8, no 8, p. e2989.

BARBOSA, Marcia, *et al.* Is atrial function in Chagas dilated cardiomyopathy more impaired than in idiopathic dilated cardiomyopathy?. *European Heart Journal-Cardiovascular Imaging*, 2011, vol. 12, no 9, p. 643-647.

BARCÁN, Laura, *et al.* Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' disease. *Liver Transplantation*, 2005, vol. 11, no 9, p. 1112-1116.

BERMUDEZ, José, *et al.* Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica*, 2016, vol. 156, p. 1-16.

BERN, Caryn, *et al.* Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA*, 2007, vol. 298, no 18, p. 2171-2181.

BERN, Caryn. Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*, 2015, vol. 373, no 5, p. 456-466.

BERN, Caryn, MARTIN, Diana L, GILMAN, Robert. Acute and congenital Chagas. *Chagas Disease*, 2011, vol. 75, p. 19.

BILATE, Angelina, CUNHA-NETO, Edecio. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 2008, vol. 50, no 2, p. 67-74.

BIRONAITE, Daiva, *et al.* Molecular mechanisms behind progressing chronic inflammatory dilated cardiomyopathy. *BMC Cardiovascular Disorders*, 2015, vol. 15, no 1, p. 26.

BOCCHI, Edimar, *et al.* The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2001, vol. 71, no 6, p. 1833-1838.

BOURGUIGNON, Saulo, *et al.* Biological aspects of the *Trypanosoma cruzi* (Dm28c clone) intermediate form, between epimastigote and trypomastigote, obtained in modified liver infusion tryptose (LIT) medium. *Acta Tropica*, 2006, vol. 98, no 1, p. 103-109.

BRENER, Zigman. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Reviews in Microbiology*, 1973, vol. 27, no 1, p. 347-382.

BRENER, Zigman. *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and Clinical Medicine. São Paulo: ISBT Brazil, 1992, vol. 92, p. 13-29.

CABALLERO, Eugenia, SANTAMARÍA, Miguel, CORRAL, Ricardo. Endogenous osteopontin induces myocardial CCL5 and MMP-2 activation that contributes to inflammation and cardiac remodeling in a mouse model of chronic Chagas heart disease. *Molecular Bases of Disease*, 2017, vol. 1864, no 1, p. 11.

CAMPBELL, David, WESTENBERGER, Scott, STURM, Nancy. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Current Molecular Medicine*, 2004, vol. 4, no 6, p. 549-562.

CHAUSSABEL, Damien, *et al.* Alteration of migration and maturation of dendritic cells and T-cell depletion in the course of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Laboratory Investigation*, 2003, vol. 83, no 9, p. 1373-1382.

CUNHA-NETO, Edecio, CHEVILLARD, Christophe. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators of Inflammation*, 2014, vol. 2014.

DE ARAUJO, Fernanda, *et al.* Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2011, vol. 5, no 5, p. e992.

DE ARAUJO, Fernanda, *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, vol. 217, no 8, p. 768-777.

DE FREITAS, Bruno, *et al.* Association of cardiac galectin-3 expression, myocarditis, and fibrosis in Chronic Chagas disease cardiomyopathy. *The American Journal of Pathology*, 2017, vol. 187, no 5, p. 1134-1146.

DE LOURDES HIGUCHI, Maria, *et al.* Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovascular Research*, 2003, vol. 60, no 1, p. 96-107.

DE MOURA BRAZ, Suellen, *et al.* Increase in the expression of CD4+ CD25+ lymphocytic T cells in the indeterminate clinical form of human chagas disease after stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Clinical Immunology*, 2014, vol. 34, no 8, p. 991-998.

DEMARCHI, Vera, *et al.* A possible role for complement in the pathogenesis of Chronic chagasic cardiomyopathy. *The Journal of Pathology*, 2002, vol. 197, no 2, p. 224-229.

DIAS, João, *et al.* Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2011, vol. 44, no 3, p. 375-379.

DÍAZ, Martha, GONZÁLEZ, Clara. Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 2014, vol. 46, no 2, p. 177-188.

DÍAZ, Martha, *et al.* Acute chagas outbreaks: molecular and biological features of *Trypanosoma cruzi* isolates, and clinical aspects of acute cases in Santander, Colombia. *Parasites & Vectors*, 2015, vol. 8, no 1, p. 608.

DOS SANTOS, Fernando, *et al.* CD8+ T cell-mediated immunity during *Trypanosoma cruzi* infection: a path for vaccine development?. *Mediators of Inflammation*, 2014, vol. 2014, p. 12.

DUTRA, Walderez, *et al.* Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunology*, 2014, vol. 36, no 8, p. 377-387.

- ELLIOTT, Perry. Diagnosis and management of dilated cardiomyopathy. *Heart*, 2000, vol. 84, no 1, p. 106-106.
- ENGMAN, Davis, *et al.* Human humoral immunity to hsp70 during *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Immunology*, 1990, vol. 144, no 10, p. 3987-3991.
- ESTUPIÑAN, Elkin, *et al.* Seroprevalencia y clasificación clínica de la Enfermedad de Chagas en el municipio de Mogotes, Santander. Documento presentado en XVI Congreso Internacional del Colegio Nacional de Bacteriología CNB-Colombia, 2016. Bogotá, Colombia.
- FARES, Rafaele, *et al.* Matrix metalloproteinases 2 and 9 are differentially expressed in patients with indeterminate and cardiac clinical forms of Chagas disease. *Infection and Immunity*, 2013, vol. 81, no 10, p. 3600-3608.
- FERNÁNDEZ, Esteban, *et al.* altered distribution of peripheral blood memory b cells in humans chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *PloS One*, 2014, vol. 9, no 8, p. e104951.
- FONSECA, Simone, *et al.* Identification of multiple HLA-A* 0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8+ epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients. *Microbes and Infection*, 2005, vol. 7, no 4, p. 688-697.
- FREITAS, Humberto, *et al.* Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology*, 2005, vol. 102, no 2, p. 239-247.
- GARRAUD, Olivier, *et al.* Class and subclass selection in parasite-specific antibody responses. *Trends in Parasitology*, 2003, vol. 19, no 7, p. 300-304.
- GIRALDO, Nicolas, *et al.* Increased CD4+/CD8+ double-positive T cells in chronic Chagasic patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2011, vol. 5, no 8, p. e1294.
- GIRALDO, Nicolás, *et al.* T lymphocytes from chagasic patients are activated but lack proliferative capacity and down-regulate CD28 and CD3 ζ . *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2013, vol. 7, no 1, p. e2038.

GOLGHER, Denise, GAZZINELLI, Ricardo. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity*, 2004, vol. 37, no 5, p. 399-409.

GOLLOB, Kenneth, *et al.* Immunoregulatory mechanisms and CD4⁻ CD8⁻ (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *International Immunopharmacology*, 2008, vol. 8, no 10, p. 1338-1343.

GOMES, J, *et al.* Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infection and Immunity*, 2003, vol. 71, no 3, p. 1185-1193.

GOMES, Juliana, *et al.* Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infection and Immunity*, 2005, vol. 73, no 12, p. 7960-7966.

GOMES, Yara, LORENA, Virginia, LUQUETTI, Alejandro. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009, vol. 104, p. 115-121.

GUO, Yujie, *et al.* Increased circulating interleukin 10-secreting B cells in patients with dilated cardiomyopathy. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, vol. 8, no 7, p. 8107.

GUTIERREZ, R, *et al.* Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area. *Parasitology*, 2004, vol. 129, no 04, p. 439-444.

HALL, Belinda, *et al.* Cell-specific activation of nuclear factor-kb by the parasite *Trypanosoma cruzi* promotes resistance to intracellular infection. *Molecular Biology of the Cell*, 2000, vol. 11, no 1, p. 153-160.

HARTLEY, Ashley, *et al.* Frequency of IFN γ -producing T cells correlates with seroreactivity and activated T cells during canine *Trypanosoma cruzi* infection. *Veterinary Research*, 2014, vol. 45, no 1, p. 6.

- HERSHBERGER, Ray, MORALES, Ana. Dilated cardiomyopathy overview. 2015.
- HIDRON, Alicia, *et al.* Chagas cardiomyopathy in the context of the chronic disease transition. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2010, vol. 4, no 5, p. e688.
- HOFT, Daniel, *et al.* involvement of cd4+ th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. Infection and Immunity, 2000, vol. 68, no 1, p. 197-204.
- HÖLSCHER, Christoph, *et al.* Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in trypanosoma cruzi-infected interleukin 10-deficient mice. Infection and Immunity, 2000, vol. 68, no 7, p. 4075-4083.
- JONES, Elizabeth, *et al.* Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1993, vol. 48, no 3, p. 348-357.
- KEESEN, T. S. L., *et al.* Characterization of CD4+ cytotoxic lymphocytes and apoptosis markers induced by *Trypanosoma cruzi* infection. Scandinavian Journal of Immunology, 2012, vol. 76, no 3, p. 311-319.
- KIRCHHOFF, Louis. Chagas disease. American trypanosomiasis. Infectious Disease clinics of North America, 1993, vol. 7, no 3, p. 487-502.
- KÖBERLE, Fritz. Chagas' heart disease and chagas' syndromes: the pathology of american tripanosomiasis. Adv Parasitol, 1968, vol. 6, p. 63-116.
- KRAUTZ, G, KISSINGER, J, KRETTLI, A. The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. Parasitology Today, 2000, vol. 16, no 1, p. 31-34.
- KRETTLI, Antoniana, BRENER, Zigman. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. The Journal of Immunology, 1976, vol. 116, no 3, p. 755-760.
- KUMAR, Sudesh, TARLETON, Rick. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. The Journal of Immunology, 2001, vol. 166, no 7, p. 4596-4603.

LASSO, Paola, *et al.* Inhibitory receptor expression on CD8+ T cells is linked to functional responses against *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic chagasic patients. *The Journal of Immunology*, 2015, vol. 195, no 8, p. 3748-3758.

LAUCELLA, Susana, *et al.* Frequency of interferon- γ -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *Journal of Infectious Diseases*, 2004, vol. 189, no 5, p. 909-918.

LENT, Herman, *et al.* Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 1979, vol. 163, no 3, p. 123-520.

LUK, Adriana, *et al.* Dilated cardiomyopathy: a review. *Journal of Clinical Pathology*, 2009, vol. 62, no 3, p. 219-225.

MACHADO, Fabiana, *et al.* CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Infectious Diseases*, 2005, vol. 191, no 4, p. 627-636.

MACHADO, Fabiana, *et al.* Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *EnSeminars in Immunopathology*. Springer-Verlag, 2012. p. 753-770.

MAGALHÃES, Luisa, *et al.* High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *Journal of Infectious Diseases*, 2013, vol. 207, no 4, p. 661-665.

MAHNKE, Yolanda, ROEDERER, Mario. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clinics in Laboratory Medicine*, 2007, vol. 27, no 3, p. 469-485.

MANOLIO, Teri, *et al.* Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute workshop). *The American Journal of Cardiology*, 1992, vol. 69, no 17, p. 1458-1466.

MARINHO, Claudio, *et al.* Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infection and Immunity*, 1999, vol. 67, no 1, p. 308-318.

MARIN-NETO, Jose, *et al.* Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, 2007, vol. 115, no 9, p. 1109-1123.

MARTIN, Diana; TARLETON, Rick. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunological Reviews*, 2004, vol. 201, no 1, p. 304-317.

MARTIN, Diana, TARLETON, Rick. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Immunology*, 2005, vol. 174, no 3, p. 1594-1601.

MATEUS, Jose, *et al.* Low frequency of circulating CD8+ T stem cell memory cells in chronic chagasic patients with severe forms of the disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2015, vol. 9, no 1, p. e3432.

MAYA, Juan, *et al.* Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 1997, vol. 86, p. 101-106.

METZGER, M, *et al.* Relevance of apoptosis and cell proliferation for survival of patients with dilated cardiomyopathy undergoing partial left ventriculectomy. *European Journal of Clinical Investigation*, 2002, vol. 32, no 6, p. 394-399.

MICHAILOWSKY, Vladimir, *et al.* Pivotal role of interleukin-12 and interferon- γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *The American Journal of Pathology*, 2001, vol. 159, no 5, p. 1723-1733.

MONCAYO, Álvaro, SILVEIRA, Antonio. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2009, vol. 104, p. 17-30.

MUHANNA, Nidal, *et al.* Amelioration of hepatic fibrosis by NK cell activation. *Gut*, 2011, vol. 60, no 1, p. 90-98.

MURATORE, Claudio, *et al.* Implantable cardioverter defibrillators and Chagas' disease: results of the ICD Registry Latin America. *Europace*, 2009, vol. 11, no 2, p. 164-168.

NORRIS, K, HARTH, G. Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. *Infection and Immunity*, 1989, vol. 57, no 8, p. 2372-2377.

OLIVARES-VILLAGOMEZ, Danyvid, *et al.* Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998, vol. 59, no 4, p. 563-570.

OLIVEIRA, J, *et al.* Increased capacity of the coronary arteries in chronic Chagas' heart disease: further support for the neurogenic pathogenesis concept. *American Heart Journal*, 1985, vol. 109, no 2, p. 304-308.

ONG, SuFey; ROSE, Noel R, CIHAKOVA, Daniela. Natural killer cells in inflammatory heart disease. *Clinical Immunology*, 2016.

ORTEGA, Yelenca, *et al.* Chagas disease immunogenetics: elusive markers of disease progression. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 2017, vol. 15, no 5, p. 367-376.

PADILLA, Angel, BUSTAMANTE, Juan, TARLETON, Rick. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Current opinion in immunology*, 2009, vol. 21, no 4, p. 385-390.

PALOMINO, S, AIELLO, V, HIGUCHI, M. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2000, vol. 94, no 6, p. 571-579.

Pan American Health Organization Chagas Disease (American Trypanosomiasis). [cited 2015 Marzo 20 de 2015]; Available from: http://www.paho.org/hq..../index.php?option=com_content&view=article&id=2382&Itemid=3922&lang=en.

PARKIN, Jacqueline, COHEN, Bryony. An overview of the immune system. *The Lancet*, 2001, vol. 357, no 9270, p. 1777-1789.

PASSOS, Livia, *et al.* Blocking of cd1d decreases *Trypanosoma cruzi*-induced activation of CD4- CD8- T cells and modulates the inflammatory response in patients with chagas heart disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 2016, vol. 214, no 6, p. 935-944.

PEREIRA-CHIOCCOLA, Vera, *et al.* Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J Cell Sci*, 2000, vol. 113, no 7, p. 1299-1307.

PEREIRA, Karen, *et al.* Chagas' disease as a foodborne illness. *Journal of Food Protection®*, 2009, vol. 72, no 2, p. 441-446.

PINAZO, Maria, GASCON, Joaquim. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Tropica*, 2015, vol. 151, p. 16-20.

PITCOVSKY, Tamara, *et al.* A functional network of intramolecular cross-reacting epitopes delays the elicitation of neutralizing antibodies to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Journal of Infectious Diseases*, 2002, vol. 186, no 3, p. 397-404.

POLYAKOVA, Victoria, *et al.* Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure-overloaded human myocardium during heart failure progression. *Journal of the American College of Cardiology*, 2004, vol. 44, no 8, p. 1609-1618.

PONCE, Nicolás, *et al.* CD73 inhibition shifts cardiac macrophage polarization toward a microbicidal phenotype and ameliorates the outcome of experimental Chagas cardiomyopathy. *The Journal of Immunology*, 2016, vol. 197, no 3, p. 814-823.

RASSI, Anis, RASSI, Sérgio. Sudden death in Chagas' disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2001, vol. 76, no 1, p. 86-96.

RASSI, A, RASSI A, RASSI, G. Fase aguda da doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, 2nd edn. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 231-45.

RASSI, Anis, DE REZENDE, Joffre. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 2012, vol. 26, no 2, p. 275-291.

RASSI, Anis, MARIN-NETO, José. Chagas disease. *The Lancet*, 2010, vol. 375, no 9723, p. 1388-1402.

REIS, Debora, *et al.* Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1993, vol. 48, no 5, p. 637-644.

RIBEIRO DOS SANTOS, Hudson. Denervation and the immune response in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Clinical and Experimental Immunology*, 1981, vol. 44, no 2, p. 349.

RIPOLL, Juan, *et al.* T cells responding to *Trypanosoma cruzi* detected by membrane TNF- α and CD154 in chagasic patients. *Immunity, Inflammation and Disease*, 2017.

RODRIGUES, Denise, *et al.* In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, vol. 2012.

RODRIGUES, Mauricio, OLIVEIRA, Ana, BELLIO, Maria. The immune response to *Trypanosoma cruzi*: role of toll-like receptors and perspectives for vaccine development. *Journal of Parasitology Research*, 2012, vol. 2012.

ROSENBERG, Charles, *et al.* Long-term immunity to *Trypanosoma cruzi* in the absence of immunodominant trans-sialidase-specific cd8+ t cells. *Infection and Immunity*, 2016, vol. 84, no 9, p. 2627-2638.

ROSSI, Marcos, SOUZA, Adriana. Is apoptosis a mechanism of cell death of cardiomyocytes in chronic chagasic myocarditis?. *International Journal of Cardiology*, 1999, vol. 68, no 3, p. 325-331.

ROSSI, Marcos, *et al.* Coronary microvascular disease in chronic Chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanisms. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2010, vol. 4, no 8, p. e674.

SALVATELLA, Roberto, *et al.* South-south cooperation for Chagas disease. *The Lancet*, 2013, vol. 382, no 9890, p. 395-396.

SCHIJMAN, Alejandro, *et al.* International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2011, vol. 5, no 1, p. e931.

SCHOFIELD, C, DIAS, J. The southern cone initiative against Chagas disease. *Advances in Parasitology*, 1999, vol. 42, p. 1-27.

SHEVACH, Ethan. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 2009, vol. 30, no 5, p. 636-645.

SILVERIO, Jaline, *et al.* Perforin-expressing cytotoxic cells contribute to chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infection. *International journal of experimental pathology*, 2010, vol. 91, no 1, p. 72-86.

SULLIVAN, Nicole L, *et al.* Deficiency of antigen-specific B cells results in decreased *Trypanosoma cruzi* systemic but not mucosal immunity due to CD8 T cell exhaustion. *The Journal of Immunology*, 2015, vol. 194, no 4, p. 1806-1818.

TARLETON, Rick, *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I-and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *International immunology*, 1996, 8(1), 13-22.

TARLETON, Rick. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. En *Seminars in immunopathology*. Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 233-238.

TEIXEIRA, Antonio, *et al.* Pathogenesis of Chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical Microbiology Reviews*, 2011, vol. 24, no 3, p. 592-630.

TEIXEIRA, Mauro, GAZZINELLI, Ricardo, SILVA, João. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends in Parasitology*, 2002, vol. 18, no 6, p. 262-265.

TELLERIA, Jenny, TIBAYRENC, Michel. American trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research. Elsevier, 2010.

TRISCHMANN, T, BLOOM, BARRY, R. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, 1982, vol. 35, no 2, p. 546-551.

TYLER, K, ENGMAN, D. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 2001, vol. 31, no 5, p. 472-481.

TZELEPIS, Fanny, PERSECHINI, Pedro, RODRIGUES, Mauricio. 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, vol. 2, no 4, p. e393.

UMEZAWA, Eufrosina, SHIKANAI-YASUDA, Maria, STOLF, Anna. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 1996, vol. 10, no 6, p. 407-413.

VEGA, Teodolinda. Informe del evento enfermedad de Chagas, hasta el periodo epidemiológico I, Colombia 2016.

VILLANI, Fernanda, *et al.* *Trypanosoma cruzi*-induced activation of functionally distinct $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ cd4- cd8- t cells in individuals with polar forms of Chagas' disease. *Infection and Immunity*, 2010, vol. 78, no 10, p. 4421-4430.

VITELLI-AVELAR, D, *et al.* Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+ CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+ CD25high regulatory T lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2005, vol. 62, no 3, p. 297-308.

WEBER, K, *et al.* Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circulation Research*, 1988, vol. 62, no 4, p. 757-765.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. [Citado el 12 de abril de 2016]. Disponible desde: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>