



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS DE ORIGEN
MIELOIDE CON FENOTIPO $CD33^+/CD14^-$
 $/CD11b^+/HLA-DR^-/iNOS^+$ Y LINFOCITOS T EN
SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON
ENFERMEDAD DE CHAGAS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

JUAN MORÁN HERNÁNDEZ.

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. LOURDES MARÍA BARRERA RAMÍREZ

COMITÉ TUTOR:
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ

MÉXICO, D.F.

JULIO, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **MORÁN HERNÁNDEZ JUAN** con número de cuenta 510007898, con la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS DE ORIGEN MIELOIDE CON FENOTIPO CD33+/CD14-/CD11B+/HLA-DR-/INOS+**", realizada bajo la dirección de la: **DRA. LOURDES MA. BARRERA RAMÍREZ.**

Presidente:	DRA.	BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ
Vocal:	DRA.	ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL
Secretario:	DRA.	GLORIA BENITEZ KING
Suplente:	DRA.	MA. DE LOURDES SEGURA VALDEZ
Suplente:	DR.	ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

Sin otro particular, me es grato enviarte un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de diciembre de 2011

Mi del Coro Arizandi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido mediante la beca de posgrado que me otorgó y gracias a la cual me fue posible dedicarme en tiempo completo al programa.

A los miembros del comité tutorial por la dirección y apoyo en mis estudios de posgrado.

Tutor principal: Dra. Lourdes Barrera Ramírez

Comité Tutorial: Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Al Dr. Pedro Antonio Reyes por su invaluable ayuda para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN.....	14
SUMMARY	15
INTRODUCCIÓN.....	16
I. ANTECEDENTES	19
1.1 Epidemiología de la enfermedad de Chagas	19
1.1.1 La enfermedad de Chagas en México	21
1.1.2 Historia Natural de la enfermedad	23
1.1.3 Diagnóstico	24
1.1.3.1 Métodos parasitológicos	25
1.1.3.2 Métodos inmunológicos	26
1.1.4 Formas clínicas.....	27
1.1.4.1 Fase aguda	28
1.1.4.2 Fase crónica indeterminada.....	29
1.1.4.3 Cardiopatía chagásica crónica.....	29
1.1.4.4 CCC vs miocardiopatía dilatada idiopática	34
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
1.2.1 Ciclo Biológico	36
1.2.2 Moléculas de superficie en <i>T. cruzi</i>	37
1.3 Mecanismos patogénicos de <i>T. cruzi</i>	39
1.3.1 Inmunosupresión, citocinas y moléculas de adhesión	39
1.3.2 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune	42
1.3.3 Respuesta inmune humoral	43
1.3.4 Respuesta inmune celular	45
1.4 Células supresoras de origen mieloide (MDSCs)	48
1.4.1 Origen y subgrupos.....	49

1.4.2 MDSCs en condiciones patológicas	52
1.4.3 Expansión y activación	54
1.4.4 Mecanismos de activación.....	56
1.4.5 Mecanismos de supresión	59
1.4.6 Mecanismos de supresión en subgrupos de MDSCs	61
1.4.7 Efectos de las MDSCs en tejidos específicos.....	62
1.4.8 MDSCs como células mieloides regulatorias.....	65
1.4.9 Metabolismo de la L-Arginina	66
1.4.10 Arginasa.....	68
1.4.11 Óxido nítrico sintasa	71
1.4.12 Regulación de células mieloides.....	72
1.4.13 Supresión de células T	74
1.4.14 Supresión dependiente de arginasa	74
1.4.15 Supresión dependiente de NOS	76
1.4.16 Supresión dependiente de la cooperación de arginasa y NOS	77
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	81
III. HIPÓTESIS	82
IV. OBJETIVOS.....	83
4.1 Objetivo General	83
4.2 Objetivos Específicos	83
V. MÉTODOS	84
5.1 Población de estudio	84
5.2 Criterios de inclusión	84
5.3 Criterios de exclusión	85
5.4 Obtención de células mononucleares de sangre periférica	86
5.5 Inmunofenotipificación de MDSCs y linfocitos T	86
5.6 Determinación de óxido nítrico en MDSCs	87
5.7 Cuantificación de Arginasa-1	87
5.8 Determinación de la actividad enzimática de Arginasa.....	87

VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	89
VII. RESULTADOS	90
7.1 Características demográficas clínicas de los pacientes estudiados	90
7.2 Caracterización fenotípica de las subpoblaciones de origen linfoide y mieloide	90
7.3 Expresión de IFN- γ y TNF- α total y en las subpoblaciones de células T CD4 ⁺ y CD8 ⁺	96
7.4 Análisis fenotípico de las subpoblaciones de MDSCs	99
7.5 Expresión de óxido nítrico (NO) en la subpoblación CD33 ⁺ /CD14 ⁻ /CD11b ⁺ /HLA-DR ⁻	101
7.6 Cuantificación de arginasa-1 en los grupos de pacientes estudiados	104
7.7 Actividad de arginasa total en plasma en los grupos de pacientes estudiados.....	105
7.8 Correlación de la frecuencia de las MDSCs y linfocitos T CD8 ⁺	106
VIII. DISCUSIÓN	107
IX. CONCLUSIONES	111
X. REFERENCIAS	113

LISTA DE ABREVIATURAS.

MDSCs	Células Supresoras de Origen Mieloide
IMCs	Células Mieloides Inmaduras
CCC	Cardiopatía Chagásica Crónica
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa inducida
NO	Óxido Nítrico
IFN- γ	Interferon gamma
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
ECG	Electrocardiograma
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
TS	<i>trans</i> -sialidasa
PI-PLC	Fosfatidilinositol-Fosfolipasa C
IL-12	Interleucina 12
TLR2	Receptor tipo Toll-2
TLRs	Receptores tipo Toll
NK-T	Células "T" Asesinas Naturales
TCR	Receptor de Células T
VCAM-1	Molécula de Adhesión Celular Vascular-1
VLA4	Antígeno Tardío-4
ICAM-1	Molécula de Adhesión Intercelular 1
LFA-1	Antígeno Asociado a la Función de Linfocitos 1
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MAC	Complejo de Ataque a Membrana

Myd88	Gen de Respuesta Primaria y Diferenciación Mieloide-88
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
Th1	Célula T Cooperadora 1
CCR5	Receptor de Quimiocina-5
TGF- β	Factor de Crecimiento Tumoral-beta
IL-13	Interleucina 13
APCs	Células Presentadoras de Antígeno
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
TAMs	Macrófagos Asociados a Tumores
EAE	Encefalomiелitis Autoinmune Experimental
CFA	Adyuvante Completo de Freund
PTGS2	Prostaglandina-Endoperoxido Sintasa 2
SCF	Factor Celular Troncal
IL-6	Interleucina 6
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos/macrófagos
G-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
STAT-3	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3
STATs	Transductores de Señal y Activadores de la Transcripción
BCL-XL	Linfoma de Células B-XL
NF- $\kappa\beta$	Factor Nuclear-kappa beta
ODC	Ornitina Descarboxilasa
OAT	Ornitine Aminotransferasa
STAT6	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 6

STAT1	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 1
CATs	Transportadores Cationicos de Aminoacidos
FAD	Flavina-Adenina-Dinucleotido
FMN	Flavina Mononucleotido
LPS	Lipopolisacarido
AP1	Proteína Activadora 1
MBP	Proteína Básica Principal
MTOR	Blanco de Rapamicina en Mamíferos
EIF2- α	Factor de Inicio de la Traducción Eucariótico 2
GC	Guanilato Ciclasa
cGMP	Guanosin Monofosfato ciclico
ERK	Cinasa Regulada a través de Señal Extracelular
RNOS	Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno
PBMC	Células Mononucleares de Sangre Periférica
PBS	Solución Salina de Fosfatos
DMSO	Dimetil Sulfoxido.
FACS	Separador Celular de Fluorescencia activada

ABBREVIATURE LIST

MDSCs	Myeloid-Derived Suppressor Cells
IMCs	Immature Myeloid Cells
CCC	Chronic Chagasic Cardiopathy
iNOS	inducible Nitric Oxide Sintase
NO	Nitric Oxide
IFN- γ	gamma Interferon
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alfa
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ECG	Electrocardiogram
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
TS	<i>trans</i> -sialidase
PI-PLC	Phosphatidylinositol-phospholipase C
IL-12	Interleukin 12
TLR2	Toll Like Receptor-2
TLRs	Toll Like Receptors
NK-T	Natural Killer T cells
TCR	T Cell Receptor
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VLA4	Very late antigen-4
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
MHC	Major Histocompatibility Complex
MAC	Membrane Attack Complex
Myd88	Myeloid Differentiation primary-response gene 88

IL-10	Interleukin 10
IL-4	Interleukin 4
Th1	T helper 1
CCR5	C-C chemokine receptor type 5
TGF- β	Tumor Growth Factor-beta
IL-13	Interleukin 13
APCs	Antigen-Presenting Cells
ROS	Reactive Oxygen Species
TAMs	Tumor-associated Macrophages
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
CFA	Complete Freund's Adjuvant
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
SCF	Stem Cell Factor
IL-6	Interleukin 6
GM-CSF	Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
JAK	Just another kinase
STAT-3	Signal Transducer and activator of Transcription 3
STATs	Signal Transducers and activators of Transcription
BCL-XL	B-cell lymphoma XL
NF- $\kappa\beta$	Nuclear Factor-kappa beta
ODC	ornithine decarboxylase
OAT	ornithine aminotransferase
STAT6	Signal Transducer and Activator of Transcription 6

STAT1	S ignal T ransducer and A ctivator of T ranscription 1
CATs	C ationic a mino- a cid t ransporters
FAD	F lavin- A denine- D inucleotide
FMN	F lavin m ononucleotide
LPS	L ipopolysaccharide
AP1	A ctivator P rotein 1
MBP	M ajor b asic p rotein
GCN2	G eneral control non-depressible 2
MTOR	M ammalian t arget o f rapamycin
EIF2- α	E ukaryotic translation initiation factor 2
GC	G uanylate c yclase
cGMP	c yclic G uanosine m onophosphate
ERK	E xtracellular-signal-regulated k inase
RNOS	R eactive n itrogen- o xide s pecies
PBMC	P eripheral b lood m ononuclear c ells
PBS	P hosphate B uffered S aline
DMSO	D imethyl S ulfoxide.
FACS	F luorescence- a ctivated c ell s orting

RESUMEN

El parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, es el agente causal de la enfermedad de Chagas humana que afecta a varios millones de personas en Centro y Sudamérica. Estudios previos han demostrado la falta de respuesta celular ante el estímulo con mitógenos durante las etapas aguda y crónica de la enfermedad de Chagas humana. Las células supresoras de origen mieloide (MDSCs) se han descrito como un grupo heterogéneo de células que se expanden durante diversas infecciones, inflamación y cáncer y tienen la capacidad de suprimir la respuesta de las células T. Con el objetivo de investigar la naturaleza de las MDSCs en la enfermedad de Chagas humana, analizamos dos subpoblaciones con fenotipo potencialmente supresor definido como CD33⁺CD14⁻CD11b⁺ y CD33⁺CD14⁻CD11b⁺HLA-DR⁻iNOS⁺ presentes en la sangre periférica de pacientes con la forma indeterminada y crónica cardíaca de la enfermedad de Chagas (CCC) así como pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática (MDI) y donadores sanos. Nuestros resultados mostraron un incremento de las dos poblaciones de origen mieloide estudiadas en los pacientes con la forma crónica cardíaca, sin embargo la enzima inducible de óxido nítrico (iNOS) sólo se encontró incrementada en la subpoblación HLA-DR⁻. Se encontró también incrementada la expresión de óxido nítrico en la segunda subpoblación estudiada. Por el contrario, la población de linfocitos T CD8⁺ se encontró significativamente disminuida en pacientes con la forma crónica cardíaca. Un análisis posterior reveló una correlación negativa con la disminución de células T CD8⁺ ($r = -0.3993$, $n=37$, correlación de Spearman, $P= 0.0143$). Por otro lado, se encontraron incrementados los niveles de arginasa-1 en los pacientes con cardiopatía chagásica crónica cuando se compararon con los pacientes indeterminados, y la actividad de arginasa total en estos dos grupos fue similar. Estos datos sugieren un papel importante de la subpoblación CD33⁺CD14⁻CD11b⁺HLA-DR⁻iNOS⁺ pudiendo mediar la inmunosupresión en los pacientes con la enfermedad de Chagas es su etapa crónica cardíaca.

SUMMARY

Trypanosoma cruzi, a protozoan parasite, is the causative agent of human Chagas' disease that affects several million people in South and Central America. Previous studies had shown the existence of deep cell unresponsiveness to mitogens during the acute and chronic phases of Chagas' disease in humans. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are a heterogeneous population of cells that expands during cancer, inflammation and infection, and that has a remarkable ability to suppress T-cell responses. In order to investigate the nature of the MDSCs in Chagas' disease, we analyzed two cell subpopulations with potential suppressor phenotype defined as CD33⁺CD14⁻CD11b⁺ and CD33⁺CD14⁻CD11b⁺HLA-DR⁻iNOS⁺ present in peripheral blood of patients with indeterminate and chronic cardiac Chagas's disease (CCC) as well as idiopathic dilated cardiomyopathy (MDI) and healthy donors. Our results show both subpopulations increased in CCC, inducible nitric oxide synthase enzyme was increased only in HLA-DR⁻ subpopulation. We also found an increase of nitric oxide (NO) producing cells with the later phenotype in CCC. On the contrary, the CD8⁺ subpopulation of lymphocytes was significantly decreased in CCC. Further analysis revealed that the CD33⁺CD14⁻CD11b⁺HLA-DR⁻iNOS⁺ subpopulation in CCC was negatively correlated with CD8⁺ T lymphocytes ($r = -0.3993$, $n = 37$, Spearman ranking test, $P = 0.0143$). We also found an increase in arginase-1 levels in MDSCs lysates of CCC. On the other hand arginase-1 levels were increased in CCC and the enzymatic activity of total arginase was similar in both groups. These data together suggest an important role of CD33⁺CD14⁻CD11b⁺HLA-DR⁻iNOS⁺ in mediating immunosuppression in patients with chronic cardiac Chagas' disease.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, es una infección sistémica y crónica que causa formas graves de cardiopatías o mega-formaciones en vísceras huecas. La enfermedad pasa por tres etapas clínicas, siendo de carácter agudo la primera, que se caracteriza por ser breve (de 4 a 8 semanas), con sintomatología no patognomónica o inexistente. Después de 8 a 10 semanas de transcurrida la etapa aguda, se presenta la etapa indeterminada que puede persistir durante años o indefinidamente sin que el individuo manifieste la enfermedad. Por último, la etapa crónica, en la que más del 30% de los individuos entrarán, de 10 a 40 años después del contacto inicial con el parásito. En esta etapa se presentan afecciones cardíacas, digestivas y con menor frecuencia, neurológicas (1, 2). Esta enfermedad que constituye un problema de salud pública en el continente americano, se ha reportado desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Chile y Argentina, está incluida dentro de las 6 enfermedades parasitarias más importantes, y de acuerdo con la OMS en 2006 existían de 15 millones de personas infectadas y 28 millones de personas en riesgo de ser infectadas. Se estima que esta enfermedad presenta 41,200 casos nuevos y 12,500 fallecimientos cada año, principalmente de estratos sociales bajos (3). La transmisión del parásito ha disminuido en la mayor parte de América del Sur, pero la enfermedad sigue siendo endémica en varias regiones de México (1). Los países que no son endémicos para la enfermedad de Chagas como Estados Unidos, Canadá, España, Japón y Australia ya presentan casos de la infección por transfusión sanguínea debido a que no se hace la prueba contra *T. cruzi* como prueba rutinaria en los bancos de sangre (4). En el reporte sobre la enfermedad de Chagas (2007) que

proporciona la Organización Mundial de la Salud (OMS) se establece claramente las necesidades de investigación y la importancia de caracterizar las manifestaciones clínicas en los países endémicos así como comparar la respuesta inmune suscitada por la infección en modelos experimentales y en la infección humana (3).

El objetivo principal de esta investigación fue conocer la frecuencia y estado funcional de la subpoblación celular de origen mieloide CD33⁺/CD14⁻/CD11b⁺/HLA-DR⁻/iNOS⁺ en sangre periférica de pacientes con la enfermedad de Chagas humana en la forma indeterminada y en pacientes con la forma cardíaca de la enfermedad (Cardiopatía Chagásica Crónica, CCC) y comparar los resultados con sujetos sanos y miocardiopatías dilatadas idiopáticas (MDI), así como conocer la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducida (iNOS o NOS2, por sus siglas en inglés) en la subpoblación CD33⁺/CD14⁻/CD11b⁺/HLA-DR⁻ y la expresión del óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés), ya que se ha reportado que es a través de la enzima iNOS y del NO, que las MDSCs ejercen su efecto inmunosupresor. Debido a que las MDSCs suprimen la respuesta de los linfocitos T, se determinó la frecuencia de las células T CD4⁺ y CD8⁺ en los grupos estudiados así como la expresión de interferón gamma (IFN- γ , por sus siglas en inglés) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés) intracelular en la mismas poblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺. Por último, se cuantificaron los niveles de arginasa-1 en plasma de los sujetos estudiados y la actividad enzimática de arginasa total, enzima involucrada en la supresión ejercida por las MDSC.

No existe un estudio en México que caracterice desde el punto de vista clínico la enfermedad en un grupo de pacientes y lo relacione con su perfil inmunológico. En este trabajo se caracterizó una población celular de estirpe mieloide, cuyo fenotipo (CD33⁺/CD14⁻/CD11b⁺/HLA⁻DR⁻/iNOS⁺) corresponde a las células supresoras de

origen mieloide (MDSCs, por sus siglas en inglés), dicha población celular se ha descrito ampliamente en pacientes con cáncer y otras patologías infecciosas (sepsis poli-microbiana, infección aguda con helmintos) (5-7) como una población parcial de las células mieloides inmaduras (IMCs, por sus siglas en inglés) que no se diferencian en células como granulocitos maduros, macrófagos o células dendríticas, teniendo como características principales la habilidad de suprimir la respuesta de células T y de proliferar sólo en condiciones patológicas.

I. ANTECEDENTES

1.1 Epidemiología de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es un fenómeno permanente en casi el 25% de la población latinoamericana (Figura 1). Existe una amplia variedad en las tasas de prevalencia, vías de transmisión, características de los parásitos (con respecto a tropismo tisular, curvas de parasitemia, etc.), patología clínica y reservorios entre una región endémica y otra. No obstante a pesar de los adelantos en los estudios epidemiológicos de la enfermedad, es difícil determinar con exactitud su incidencia y prevalencia. La enfermedad puede encontrarse desde la latitud 42°N (Norte de California) a la latitud 46°S (Sur de Argentina y Chile), sin embargo la distribución de vectores silvestres y reservorios es mayor a la de la enfermedad humana (8). Los cambios económicos y sociales en las cuatro últimas décadas han estimulado la migración humana desde las áreas rurales hacia las ciudades, incluso las de los países no endémicos, fenómeno que ha sido denominado como “globalización de la enfermedad de Chagas” y que favorece que las tasas de incidencia, mortalidad y prevalencia, estén en constante cambio (4) (Figura 2).



Figura 1. Prevalencia de la Enfermedad de Chagas en America (Número de personas infectadas por cada 100) (Imagen modificada desde: Grayson, Chagas disease, Nature-Outlook, 2010).

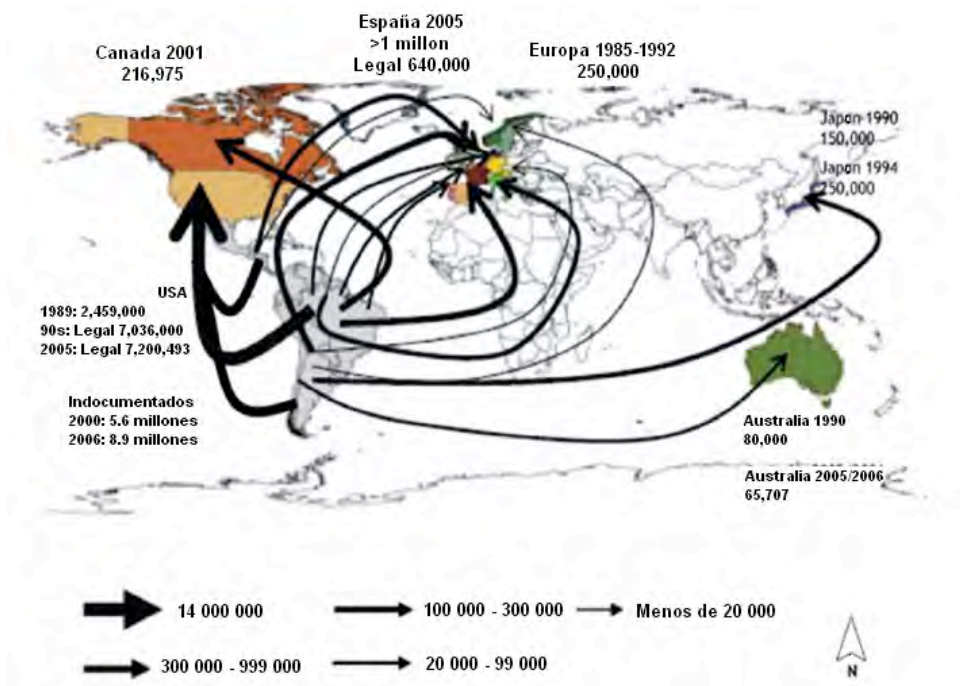


Figura 2. Globalización de la enfermedad de Chagas desde zonas endémicas hacia zonas no endémicas. (Imagen modificada desde: Franco-Paredes, PLoS Negl Trop Dis, 2009).

1.1.1 La enfermedad de Chagas en México

En México en una revisión realizada hasta 2006 el número total de casos humanos, reportados en la literatura fue de 16,979 y la distribución por estado se muestra en la Figura 3a, 3b. Esta estimación, es resultado de un análisis de la distribución geográfica de la enfermedad de Chagas en México (9) y representa una subestimación de la situación real de la enfermedad en el país, ya que existen casos sin diagnosticar y sin documentarse, habiendo por lo tanto, un grado de incertidumbre alrededor de este dato (9). Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud, estima una incidencia anual por transmisión vectorial de 7,700 nuevos casos con una prevalencia actual de 1,100,000 personas infectadas y a una población expuesta en zonas endémicas de 29,500,000 personas (10). En cuanto a la prevalencia de la serología positiva en bancos de sangre en México, el mismo estudio (9), mostró que de los 32 estados, 12 tuvieron casos positivos para *T. cruzi*, siendo el estado de Morelos y el Distrito Federal las dos entidades con mayor prevalencia de seropositividad en bancos de sangre de hospitales de salud pública del país. Un total de 117,733 sueros fueron analizados y 2,388 resultaron positivos (9) (Figura 4).

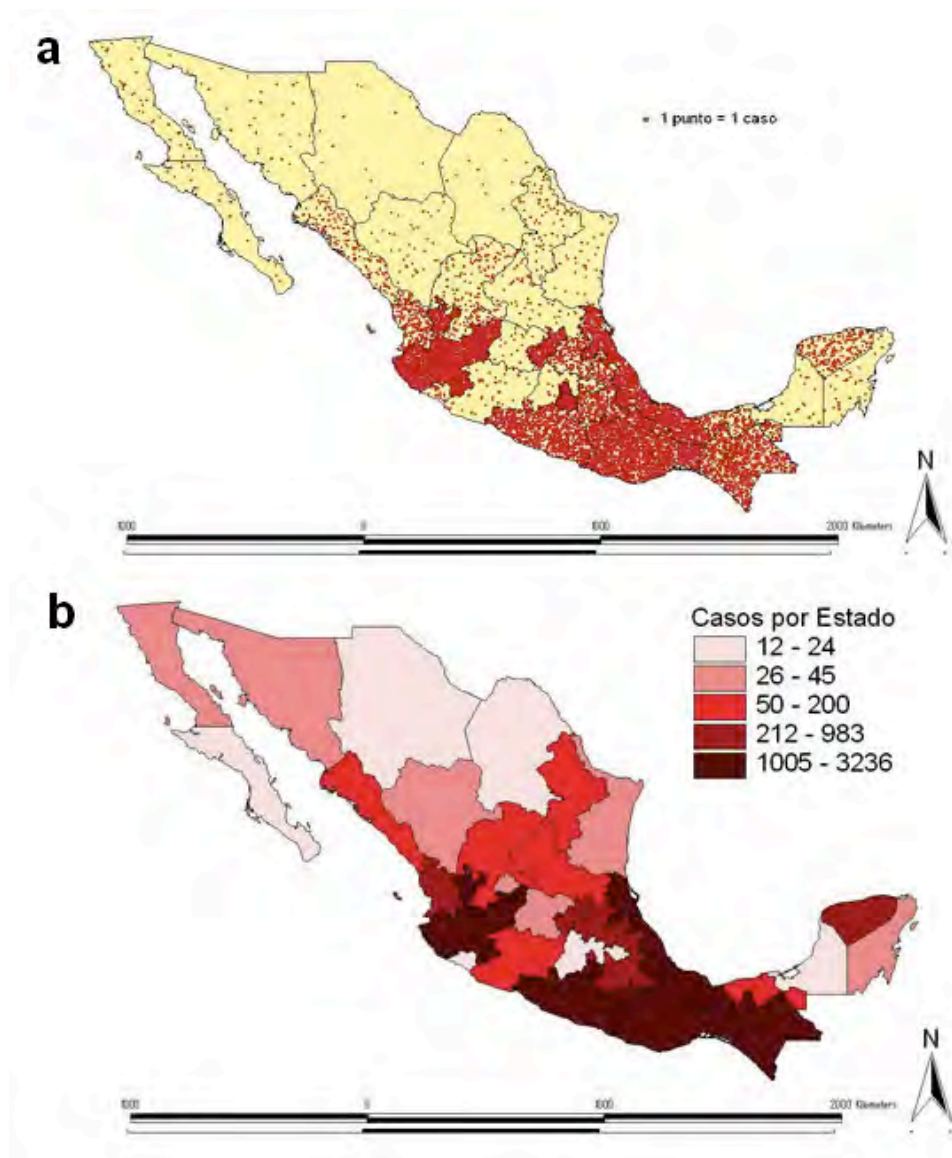


Figura 3. Mapa de México que muestra el rango de casos de la enfermedad de Chagas registrados a través de ensayos serológicos, de manifestaciones clínicas y casos de transfusiones sanguíneas a) Mapa de México que muestra la distribución aleatoria de casos humanos a partir de análisis serológicos hasta el 2004. (Imagen modificada desde: Cruz-Reyes, Mem Inst Oswaldo Cruz, 2006). b) Mapa de México que muestra el número de casos por estado.

Con respecto a la distribución de los vectores triatominos en México, sin considerar subespecies, existen 30 especies de triatominos pertenecientes a siete diferentes géneros: *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma*, *Panstrongylus*, *Rhodnius* y *Triatoma*. En base a su hábitat domiciliar y a la facultad de defecar inmediatamente después de alimentarse de la sangre del huésped, nueve de estas treinta especies

son considerados vectores importantes del parásito. Sin embargo se ha reportado que 21 especies albergan al parásito (11-13).

Al menos 97 cepas del parásito se han obtenido desde tres fuentes: humanos, vectores y reservorios (domésticos y silvestres) (9).

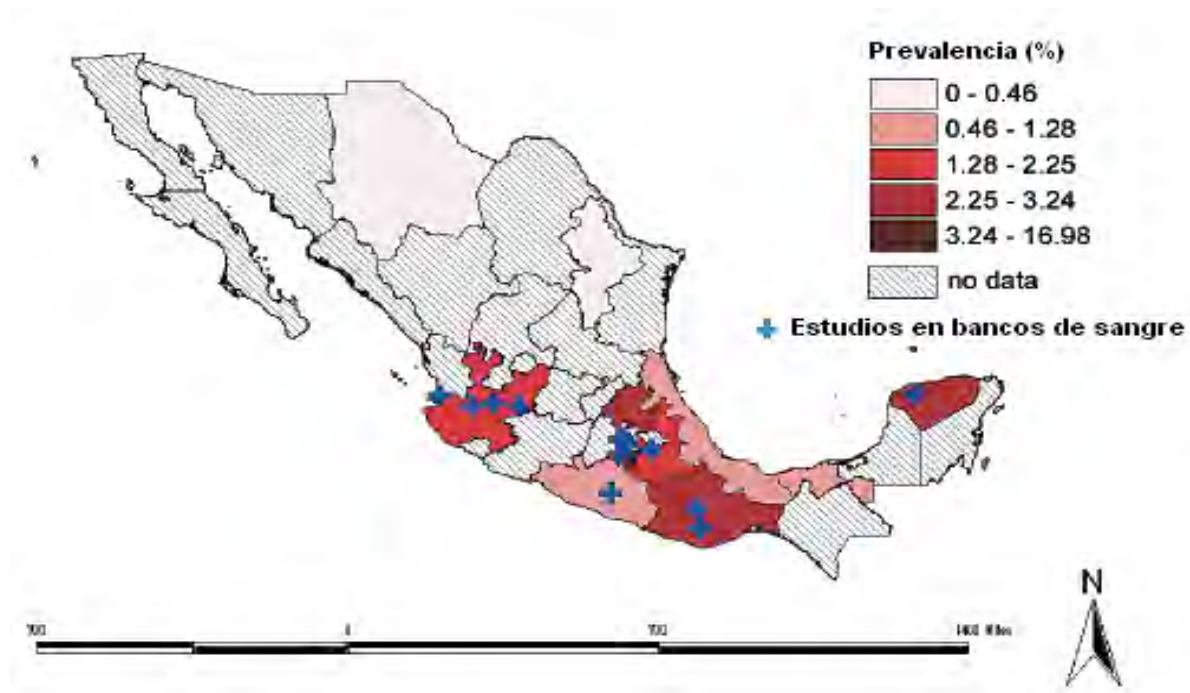


Figura 4. Prevalencia de serología positiva en bancos de sangre, 1978-2004 (Imagen modificada desde: Cruz-Reyes, Mem Inst Oswaldo Cruz, 2006).

1.1.2 Historia Natural de la enfermedad

La historia natural de la enfermedad de Chagas es la de una infección parasitaria sistémica y crónica, cuyo agente etiológico es el parásito protozoario *T. cruzi*. Lleva del 20 al 30% de los infectados a formas graves de cardiopatía o mega formaciones digestivas (3). Es transmitida por vectores triatominos contaminados de la familia *Reduviidae* (14) y se transmite al humano por las heces infectadas del triatomo hematófago a través de la picadura del insecto en la piel o a través de las membranas mucosas, incluyendo la conjuntiva, mucosa bucal o digestiva (15). Los insectos se convierten en vectores cuando pican a hospederos infectados con *T. cruzi* (animales o humanos). Desde el punto de vista epidemiológico, la historia

natural de la enfermedad chagásica humana tiene importancia médica y social. Primero, la infección por *T. cruzi* depende de varios factores, tales como la densidad de triatomíneos domiciliarios, las especies de vectores prevalentes y su tasa de infección, el número de donadores de sangre infectados con *T. cruzi* y el control de calidad en bancos de sangre. El periodo de incubación es de 8 a 10 días para la transmisión vectorial y puede llegar a ser mucho más largo (100 días o más) para el caso transfusional (16). La enfermedad aguda no tratada tiene una duración de 4 a 12 semanas aproximadamente. Después de esto, la fiebre y otros síntomas empiezan a desaparecer, paralelamente hay una disminución progresiva de la parasitemia y aumento gradual de anticuerpos IgG específicos (17). La cardiopatía crónica es importante, debido a su morbi-mortalidad y el consecuente impacto social y médico. La mortalidad por la enfermedad de Chagas es significativa en Brasil, Argentina, Bolivia, Venezuela y Norte de Chile, y depende básicamente de la cardiomiopatía severa (8).

El impacto económico y social de esta enfermedad es alto; en 7 países localizados al sur de América, se estima que alrededor de 752 mil personas fallecen en edad productiva lo cual corresponde a una pérdida de 1,208 millones de dólares por año (18). Esta enfermedad a diferencia de otras enfermedades parasitarias, se relaciona con el desarrollo socio-económico de cada país y frecuentemente se asocia a enfermedades "sociales típicas", tales como desnutrición, diarrea, tuberculosis y otras enfermedades parasitarias (2).

1.1.3 Diagnóstico

Desde el descubrimiento de la enfermedad de Chagas, han sido utilizados numerosos métodos parasitológicos e inmunológicos, algunos han mostrado a

través del tiempo y de numerosos estudios una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad aceptables.

La presencia de formas parasitarias y de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* constituyen los elementos más relevantes para el diagnóstico de laboratorio; por esta razón, los métodos de diagnóstico son clasificados en parasitológicos e inmunológicos.

1.1.3.1 Métodos parasitológicos.

Son de elección en la fase aguda, debido a que permiten demostrar la presencia del parásito en sangre, también son útiles para el diagnóstico intencionado de las formas transplacentaria y neonatal o en algunos casos atípicos o de difícil diagnóstico como los adquiridos por vía transfusional o por trasplante de órganos (19).

El examen directo, gota gruesa y frote sanguíneo se emplean para observar al microscopio los tripomastigotos sanguíneos, lo cual permite establecer el diagnóstico especialmente en las formas agudas de la enfermedad (19).

Con el propósito de incrementar la sensibilidad diagnóstica, se pueden utilizar métodos de concentración como el *Strout* y microhematocrito con lo que la sensibilidad puede aumentar hasta un 95% (19).

Otros métodos útiles con el fin de ampliar el número de microorganismos son el xenodiagnóstico en serie que es un método parasitológico indirecto, y requiere de triatominos de laboratorio para asegurar que estos no contengan parásitos. Se realiza con 30 a 40 triatominos colocados en 4 u 8 cajas que se disponen sobre el brazo del paciente para que éstos se alimenten; 30 y 60 días después las heces de los insectos se analizan bajo el microscopio buscando la presencia del parásito.

El hemocultivo durante muchos años no fue utilizado para el diagnóstico parasitológico porque autores como Freitas (1952) obtuvieron resultados negativos o positividad baja. Sin embargo, Chiari y Brener en 1966 obtuvieron un 31.8% de positividad usando medio LIT, y a partir de esa época el hemocultivo comenzó a ganar credibilidad, Mourao en 1975 introdujo un procedimiento para eliminar anticuerpos, plasma y otros factores que pudieran limitar el crecimiento del parásito y así lograr aumentar la sensibilidad de esta técnica diagnóstica. Posteriormente Luz y cols. en 1994 obtuvieron un 94% de positividad en pacientes chagásicos haciendo cultivos seriados (19, 20).

1.1.3.2 Métodos inmunológicos.

En términos generales el inmunodiagnóstico se realiza con base a dos criterios distintos: 1) Cuando se requiere detectar fácil y rápidamente un individuo infectado, como es el caso del donador o receptor de sangre u órganos así como en estudios con fines epidemiológicos; estas pruebas, denominadas de tamizaje o "screening", deben presentar una alta sensibilidad aun cuando la especificidad sea baja (21).

2) Cuando sea necesaria una detección precisa para la confirmación de casos que así lo requieran por los antecedentes clínicos o epidemiológicos, en cuyo caso se realizará con una o dos pruebas diferentes a la inicial (21).

Los métodos serológicos para estos fines, son valorados por su nivel de reactividad; así, existen aquellos que detectan concentraciones muy bajas de anticuerpos como es el caso del inmunoensayo enzimático (ELISA, por sus siglas en inglés); los de reactividad intermedia como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la hemaglutinación indirecta (HAI) y los de baja reactividad como la reacción de fijación de complemento; los ensayos de aglutinación directa o con partículas, así como los que se realizan en placas de agar, estas últimas cada vez más en desuso, algunas

por su complejidad técnica, otras por su dificultad para el manejo de grandes cantidades de muestras y otras por su difícil reproducibilidad por el tipo de reactivos empleados (22, 23).

Para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, la OPS/OMS recomienda especialmente el uso de las siguientes pruebas:

1. Hemaglutinación indirecta (HAI).
2. ELISA.
3. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

La OMS define para la confirmación del diagnóstico demostrar reactividad en dos pruebas serológicas. La positividad en una sola prueba serológica no constituye un criterio de diagnóstico suficiente. Si se realizan dos pruebas simultáneamente IFI/ELISA, IFI/HAI, o ELISA/HAI, la certeza diagnóstica estará entre el 98 y 99.5%; resultados séricos con reactividades discordantes deben ser sometidos a una tercera evaluación con otra técnica y en caso de repetirse la discordancia, realizar nuevamente el procedimiento con una nueva muestra (22-24).

1.1.4 Formas clínicas

Las formas clínicas de la enfermedad de Chagas de acuerdo al criterio de la OMS son una fase aguda y una fase crónica, esta última dividida en una forma asintomática o indeterminada y una forma sintomática (Cardiopatía Chagásica Crónica), que es la más relevante desde el punto de vista clínico (25). Los síntomas clínicos de la infección aguda por *T. cruzi* y de la enfermedad de Chagas crónica son muy diferentes. El primer caso se debe al primer encuentro del huésped con el parásito y a su diseminación por el organismo, mientras que en la fase crónica se producen una serie de secuelas a largo plazo con ciertas discrepancias en cuanto a su fisiopatología (26).

1.1.4.1 Fase aguda

La fase aguda se debe al parásito y a la respuesta inmune inflamatoria provocada por éste, fundamentalmente de tipo Th1. Se caracteriza por presentar parasitemia circulante detectable en sangre periférica y, aproximadamente en el 90% de los casos, no se presenta sintomatología (26). Se da principalmente en niños menores de 12 años pasando la mayor parte de los casos desapercibida debido a la falta de especificidad de los síntomas, pero también en muchos casos debido a la dificultad de acceso de esta población a asistencia médica. La sintomatología en esta fase depende, en cierta medida, del modo en que se ha producido la transmisión, en el caso de la transmisión vectorial, la fase aguda aparece entre los 5 y los 14 días tras la infección, se mantiene alrededor de dos meses y dependiendo del sitio de inoculación, el primer signo puede ser la forma cutánea (Chagoma) o el edema orbital unilateral púrpura (Signo de Romaña) con linfadenopatías locales y fiebre que dura varias semanas. Puede ser acompañada con dolor de cabeza, palidez, mialgias, disnea, edema en miembros inferiores o en la cara, dolor abdominal, tos, hepatomegalia, exantema, nódulos dolorosos, esplenomegalia, edema generalizado, diarrea, linfadenopatías múltiples, miocarditis (dolor de pecho, insuficiencia cardíaca) y más raramente meningoencefalitis (convulsiones, parálisis) (15).

En el caso de transmisión congénita el 65% de los pacientes permanecen asintomáticos. El resto de los casos pueden manifestarse, después de 10-14 días, con hepatoesplenomegalia (28%), hepatitis (11%), sepsis (9%), meningitis (5%), miocarditis (4%) o anemia hemolítica (2%) (27).

Cuando la infección se ha adquirido por transfusión sanguínea, a pesar de la presencia de una alta parasitemia inicial, la sintomatología en la fase aguda es eventual, pasando la mayoría de los casos desapercibidos.

1.1.4.2 Fase crónica indeterminada

La fase crónica con parásitos ocultos en los tejidos blanco, especialmente el corazón y el músculo liso digestivo, tiene dos diferentes formas clínicas posibles, la fase crónica indeterminada y la fase crónica sintomática cardíaca o digestiva. La fase crónica indeterminada inicia cuando los síntomas de la fase aguda desaparecen. Los pacientes indeterminados permanecen asintomáticos y no hay evidencia de afectación orgánica en las pruebas realizadas, presentando títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* positivos y una parasitemia subclínica fluctuante; esta fase la presentan el 70% de los infectados con el parásito *T. cruzi* en los que desaparece la forma aguda de la enfermedad, lo cual ocurre en el 95% de los casos (15).

En los pacientes con inmunosupresión suele producir un aumento importante de la parasitemia, lo que puede generar consecuencias graves y manifestarse en forma de meningoencefalitis (79%) o de miocarditis aguda (25%). Los casos de miocarditis aguda por reactivación pueden confundirse con la progresión de una miocardiopatía chagásica crónica, pero los primeros suelen presentar parasitemias muy altas fácilmente detectables con métodos parasitológicos directos. Realizar un correcto diagnóstico diferencial de estas dos entidades es importante ya que tiene implicaciones terapéuticas diferentes (28).

1.1.4.3 Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC).

La patología más importante de la enfermedad de Chagas se desarrolla de 10 a 30 años después de la infección primaria y afecta varios órganos internos, principalmente, corazón, esófago y colon, así como también el sistema nervioso periférico. El corazón es el órgano afectado con mayor frecuencia en los pacientes

chagásicos, desarrollando cardiopatías e insuficiencia cardíaca, siendo esto la principal causa de muerte. La CCC es, por lo tanto la manifestación más devastadora de la enfermedad de Chagas (29).

La CCC puede ser considerada una enfermedad progresiva, en la cual la inflamación y fibrosis del miocardio juegan un papel esencial. En pacientes cardiopatas chagásicos crónicos con fallo cardíaco, se encuentran altos porcentajes de miocarditis severa, fibrosis e hipertrofia miocárdica en comparación con pacientes en fase indeterminada y con arritmia cardíaca. El estudio macroscópico del corazón de pacientes con CCC que fallecieron por fallo cardíaco, se muestra alargamiento biventricular con aneurismas apicales. Además, los individuos con CCC frecuentemente desarrollan trombosis mural (trombo que está en contacto con la pared endocárdica de una cámara cardíaca) lo que puede causar accidente cerebrovascular. En cortes histológicos de corazón, se observa fibrosis intersticial difusa, infiltrado linfocitario y daño de miocitos, estos hallazgos se presentan en ausencia aparente de parásitos. En el sistema de conducción del corazón, se han detectado también fibrosis e inflamación crónica lo que explica la alta incidencia de arritmias (29).

Aunque la fase aguda y crónica de la enfermedad comparten hallazgos patológicos similares, aún no es claro si operan mecanismos patológicos similares. Al respecto, al parecer el infiltrado de células T CD4⁺ median la respuesta inmune en la fase aguda de la enfermedad, mientras que las células T CD8⁺ predominan en la fase crónica de la enfermedad (30). Por otra parte es posible que el comportamiento de la patología en la fase aguda module el resultado final de la fase crónica (29). A la fecha se han descrito muchos mecanismos que explican cómo es que se desarrolla la patología cardíaca. Estos pueden estar mediados directamente por el parásito o

causados por un mecanismo inflamatorio, inmune o autoinmune o por una combinación de estos. Estos mecanismos son resumidos a continuación:

Daño neuronal primario resultando en denervación del sistema autónomo parasimpático en el corazón. Este fue uno de los primeros mecanismos patogénicos descritos en la fase aguda (31, 32). Sin embargo estudios posteriores solo han mostrado daño ligero neuronal en el corazón, sugiriendo que las lesiones neuronales son epifenómenos, secundarios a la inflamación y fibrosis (33-35).

Daño a cardiomiocitos, inducido por *T. cruzi*, debido al efecto citopático causado por la infección intracelular con los amastigotos o por la liberación de productos de *T. cruzi* secretados, lo cual puede ser tóxico para las células y tejidos del huésped (36). Esto es un mecanismo obvio pero que quizá tiene solo alguna relevancia en la fase aguda y en pacientes altamente parasitados o con inmunosupresión.

Cambios microvasculares inducidos por el parásito quizá llevan a la hipoperfusión y finalmente a la degeneración de los miocitos e inflamación crónica (37, 38).

La persistencia de antígenos de *T. cruzi* quizá desencadene la respuesta específica mediada por células T CD4⁺ ó CD8⁺ que lleva al daño de las células infectadas; o dicha persistencia quizá provoque un proceso conocido como activación inespecífica de células T (en inglés, "*bystander activation*"), en el cual ocurre la activación inespecífica de células T contra un antígeno Y pero que son específicas para un antígeno X (39), se ha reportado que esta activación inespecífica de células T puede conducir a un estado de autoinmunidad (40-43). El proceso "*bystander activation*" puede ocurrir de manera dependiente o independiente del receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) (29). Estos mecanismos pueden tener lugar tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad de Chagas (29).

Un punto importante, que a menudo se ignora en este campo de debate es que ninguno de los mecanismos mencionados anteriormente se excluye mutuamente. Por otra parte, parece poco probable que el daño del corazón sea atribuido a uno solo de estos mecanismos (29).

Las citocinas y quimiocinas producidas en respuesta al parásito quizá sobre regulan a la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1, por sus siglas en ingles), el cual, es el receptor de la integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA4, por sus siglas en inglés) y sobre regulan también a la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1, por sus siglas en ingles), cuyo ligando es el antígeno asociado a la función del linfocito (LFA-1, por sus siglas en ingles). Estas moléculas de adhesión se incrementan en las células endoteliales de pacientes, lo que ayuda al reclutamiento de linfocitos T CD8⁺/LFA-1⁺/VLA-4⁺ (44). Al respecto, se ha propuesto un papel para las moléculas de adhesión celular, receptores de integrinas, componentes de la matriz extracelular, metaloproteinasas y quimiocinas, en el reclutamiento y migración de células inflamatorias y de células CD8⁺ hacia el corazón y otros tejidos susceptibles del huésped (45, 46). Cabe señalar que componentes de la matriz extracelular pueden absorber antígenos del parásito y citocinas lo cual podría contribuir al establecimiento y perpetuación de la inflamación. Más aún, se ha encontrado que *T. cruzi* requiere de integrinas $\beta 1$ para ganar acceso a las células (47). La respuesta inflamatoria, que probablemente es recurrente y que tiene periodos mayor de exacerbación, es responsable probablemente del daño neuronal, de las alteraciones en la microcirculación, de la deformación de la matriz cardiaca y consecuentemente del fallo en el órgano (48).

Los pacientes con CCC, tienen una expresión incrementada de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en ingles). Por lo tanto

las moléculas del MHC clase I, están sobre-reguladas en los miocitos del miocardio (48) y existe también evidencia de una sobre-expresión de las moléculas del MHC clase I en células endoteliales. Esto quizá favorezca la presentación de antígenos críticos al infiltrado de células T (49).

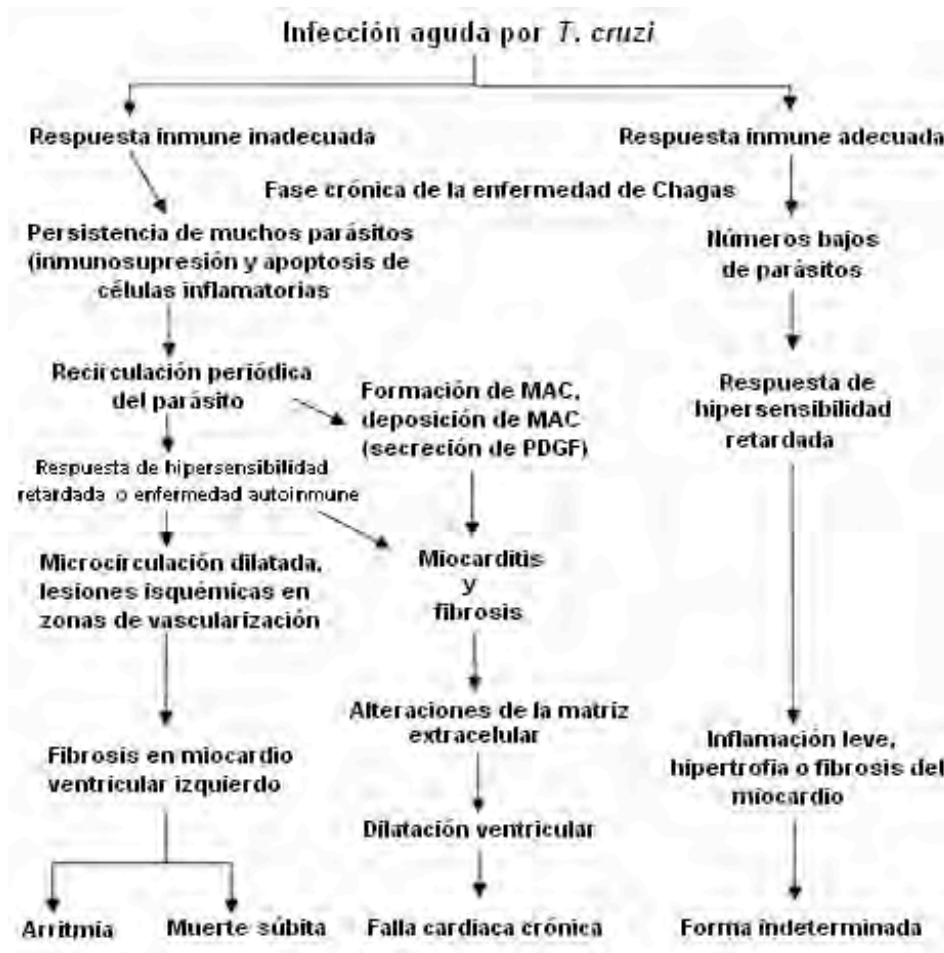


Figura 5. Esquema hipotético de los principales factores involucrados en la cardiopatía chagásica crónica y las interacciones que pueden llevar a diferentes lesiones cardíacas (MAC, por sus siglas en inglés). (Imagen modificada desde: Higuchi Mde Cardiovas Res. 2003).

Higuchi y col. proponen en un esquema hipotético los principales factores involucrados en la CCC (Figura 6). Pacientes con una respuesta inmune adecuada quizá puedan evitar la infección parasitaria sintomática desarrollando la forma indeterminada de la enfermedad. Una respuesta inmune inadecuada en el huésped favorece el desbalance que lleva al desarrollo de una respuesta inmune inadecuada

permanente contra el parásito. La respuesta inflamatoria es quizá recurrente llevando al paciente a una forma crónica cardíaca caracterizada por un daño neuronal, deformación de la matriz extracelular en corazón y por consiguiente fallo cardíaco (48).

1.1.4.4 CCC vs. Miocardiopatía dilatada idiopática.

La miocardiopatía dilatada idiopática (MDI) es una alteración en el funcionamiento del corazón dilatado, sin evidencia de enfermedad arterial coronaria, enfermedad de válvula cardíaca, malformación cardíaca congénita o enfermedad de corazón hipertensiva. La CCC es frecuentemente usada como un modelo de una miocardiopatía dilatada con una etiología definida ya que ambas patologías tienen un desorden similar en la estructura cardíaca que lleva a la dilatación ventricular. Se han realizado trabajos experimentales con *T. cruzi* con el objetivo de alcanzar un mejor entendimiento de la cardiopatía dilatada idiopática y su tratamiento. La MDI, en contraste con la CCC, es caracterizada usualmente por la ausencia de miocarditis (en algunos casos miocarditis leve) y fibrosis en menor medida, la cual no rodea a las fibras del miocardio. En la MDI es importante una red de colágeno que envuelve a las fibras del miocardio, atándolas unas a otras lo que favorece el mantenimiento de la forma normal y la contracción eficiente del corazón (50, 51). En la MDI ocurre una atenuación y ruptura de las conexiones de la matriz extracelular que podría favorecer el deslizamiento de las fibras del miocardio que son delgadas y estiradas. En la enfermedad de Chagas, la característica más importante es una acumulación de colágeno densa que encierra cada fibra del miocardio, lo que probablemente previene su distensión y contracción. La presencia de antígenos parasitarios quizá induce fibrogénesis. Los linfocitos del miocardio quizá también favorecen el

desarrollo de la fibrosis a través de la producción de citocinas y de factores de crecimiento (52). Benvenuti y col. al investigar el papel que tenía el sistema de complemento en la patogénesis de la CCC y de la MDI, encontraron que el miocardio de los sujetos con CCC tenían un mayor depósito de moléculas del complejo de ataque a membrana del sistema de complemento (MAC, por sus siglas en inglés) (C3, C5b-9) que en los sujetos con MDI, lo cual da una posible explicación de la fibrosis en el miocardio y de la inflamación presentes en los pacientes con CCC y ausentes en los sujetos con MDI (53).

Metzger y col. analizaron si ocurría apoptosis en células del miocardio de pacientes con CCC con fallo severo de corazón. La apoptosis se detectó por medio de un ensayo fluorescente (TUNEL assay, Roche) y por la identificación de caspasa-3 a través de inmunohistoquímica en fragmentos del miocardio de pacientes con CCC. Por ambos métodos, se detectaron altos números de células apoptóticas en todos los fragmentos analizados. Sin embargo todas las células apoptóticas detectadas fueron células intersticiales y no cardiomiocitos (54). La mayoría de las células apoptóticas intersticiales identificadas mostraron características de las células mononucleares inflamatorias. El mismo estudio indicó que gran parte de las células apoptóticas eran positivas para el marcador CD68, demostrando también que la apoptosis de las células T CD4 no parecía ser un evento importante en la enfermedad de Chagas crónica humana (54). Rossi y col. tuvieron resultados similares al hacer estudios de apoptosis en cardiomiocitos a través del método fluorescente (TUNEL-staining), lo que llevo a concluir que la ausencia de apoptosis en cardiomiocitos podría involucrar a la necrosis como el mecanismo de muerte que lleva a la pérdida del funcionamiento del miocardio en los CCC (55).

1.2 *Trypanosoma cruzi*.

1.2.1 Ciclo biológico

T. cruzi presenta tres morfologías distintas: epimastigoto, que se replica en el insecto vector triatomino; tripomastigoto, que infecta las células del hospedador vertebrado; y amastigoto que se replica intracelularmente en el hospedador mamífero (56, 57).

La transmisión de *T. cruzi* a humanos ocurre cuando las heces liberadas por el insecto triatomino contienen tripomastigotos metacíclicos infectivos y penetran a través de la piel en el torrente sanguíneo mientras el insecto succiona sangre del hospedador. Es ahí donde las formas flageladas del parásito infectan una amplia variedad de células del hospedador (fundamentalmente macrófagos y cardiomiocitos). Una vez en el interior de la célula, las formas tripomastigoto se transforman a amastigoto, los cuales se multiplican. Después de esto los amastigotos salen de las células y dan lugar a tripomastigotos, que son liberados al torrente sanguíneo donde se diseminan e infectan nuevas células. Es en esta etapa cuando los parásitos son succionados del torrente sanguíneo por el triatomino mientras se alimenta de sangre. Una vez en el estómago del insecto, los tripomastigotos se transforman en epimastigotos y se multiplican a través del tracto digestivo hasta llegar a los intestinos donde se transforman en tripomastigotos metacíclicos y son liberados con las heces cuando el triatomino toma la sangre desde un vertebrado (58) (Figura 6).

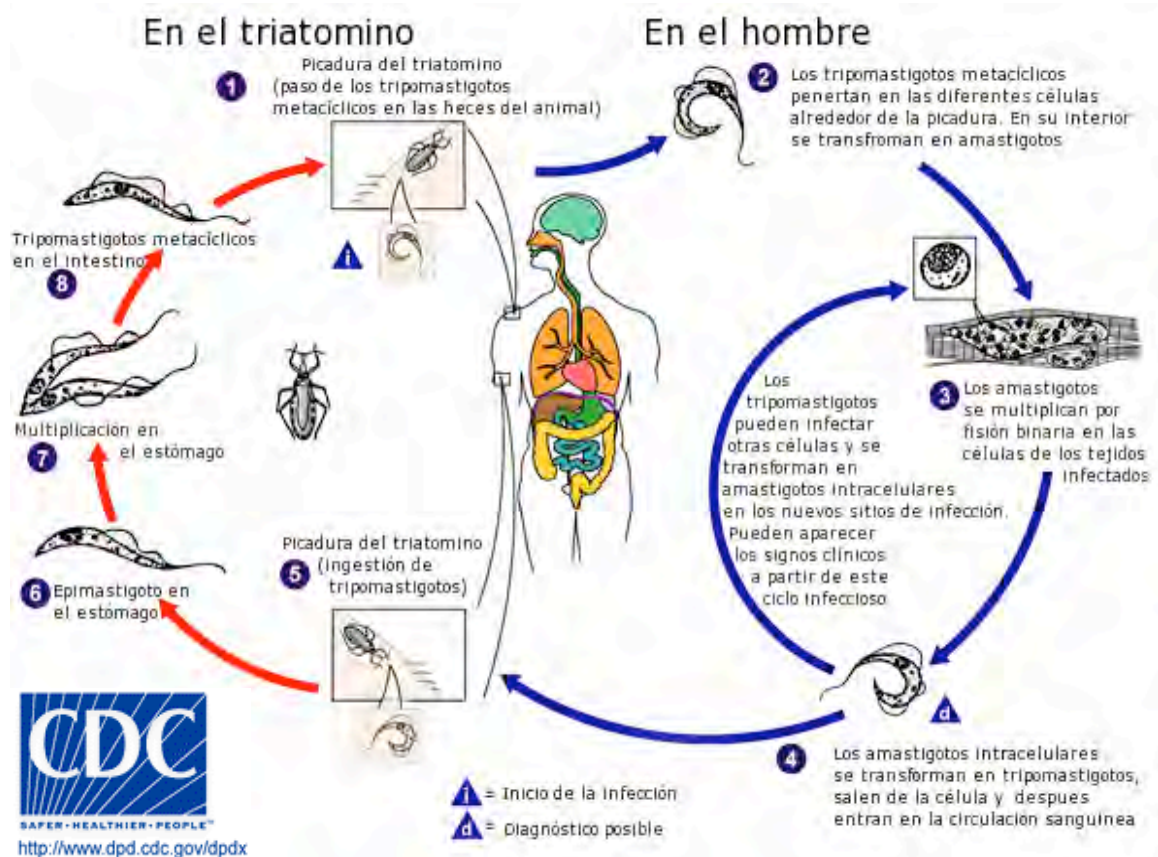


Figura 6. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. *T. cruzi* presenta diferentes morfologías durante su ciclo de vida, éste inicia cuando un triatomino pica al humano y el parásito pasa a través de la piel en forma de tripomastigoto metacíclico penetrando las diferentes células alrededor de la picadura y en su interior se transforman en amastigotos, estos se multiplican por fisión binaria en las células y una vez que las llenan salen en forma de tripomastigotos hacia la circulación sanguínea y el ciclo se completa cuando otro triatomino vuelve a picar al humano e ingiere al parásito en su forma infectiva que es el tripomastigoto metacíclico, este se transforma en epimastigoto en el estómago y posteriormente se divide también en el estómago. Ya en el intestino se convierte en tripomastigoto metacíclico y termina el ciclo cuando pica a otra persona (Imagen modificada desde: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>).

1.2.2 Moléculas de superficie en *Trypanosoma cruzi*.

La mayoría de los componentes de superficie de *Trypanosoma cruzi* están anclados a la capa externa de fosfolípidos de la membrana plasmática por el glicosilfosfatidilinositol (GPI, por sus siglas en inglés). Dichos componentes son en su mayoría glicoproteínas llamadas mucinas, las cuales le confieren protección al parásito y le permiten invadir a las células del hospedero infectado (59). El núcleo polipeptídico de las mucinas consiste en péptidos de 50 a 200 aminoácidos y sus secuencias son ricas en residuos de serina y treonina, los cuales son sitios aceptores de oligosacáridos, adicionados a grupos hidroxilo o a los átomos de

oxígenos de dichos aminoácidos, por tanto dichas mucinas están altamente *O*-glicosiladas por *O*-oligosacáridos (59).

Aunque en mucha menor cantidad, también están presentes otras glicoproteínas en la superficie del parásito *T. cruzi*. La más relevante y de importancia biológica es la trans-sialidasa (TS, por sus siglas en inglés) (59). La molécula TS transfiere residuos de ácido siálico desde glicoconjugados del huésped hacia las mucinas del parásito. La actividad de la TS de *Trypanosoma cruzi* es única ya que no usa una molécula de Citidina monofosfato-ácido siálico como monosacárido donador y está localizada en la superficie del parásito y no en el Aparato de Golgi (60). Además de transferir ácido siálico, las moléculas TS pueden unirse a receptores celulares de mamíferos quebrantando así los mecanismos de defensa del huésped (61-66) (Figura 7). Hay una superfamilia de genes de TS en *Trypanosoma cruzi* con alrededor de 70 miembros que codifican para productos enzimáticos activos (60). Un segundo grupo de alrededor de 70 genes codifican productos inactivos enzimáticamente a pesar de ser 95% idénticos a los productos TS activos. Estos productos inactivos son capaces de unirse al ácido siálico y a residuos terminales de galactosa, indicando un posible papel de estas moléculas en la unión del parásito a superficies celulares (60). Se ha sugerido que la actividad de la TS le permite al parásito *T. cruzi* hacer frente a su imposibilidad de sintetizar ácido siálico *de novo* (67). Las principales moléculas aceptores de ácido siálico en *T. cruzi* son las mucinas; la sialilación de las moléculas de superficie, es crucial para la viabilidad y propagación del parásito (68).

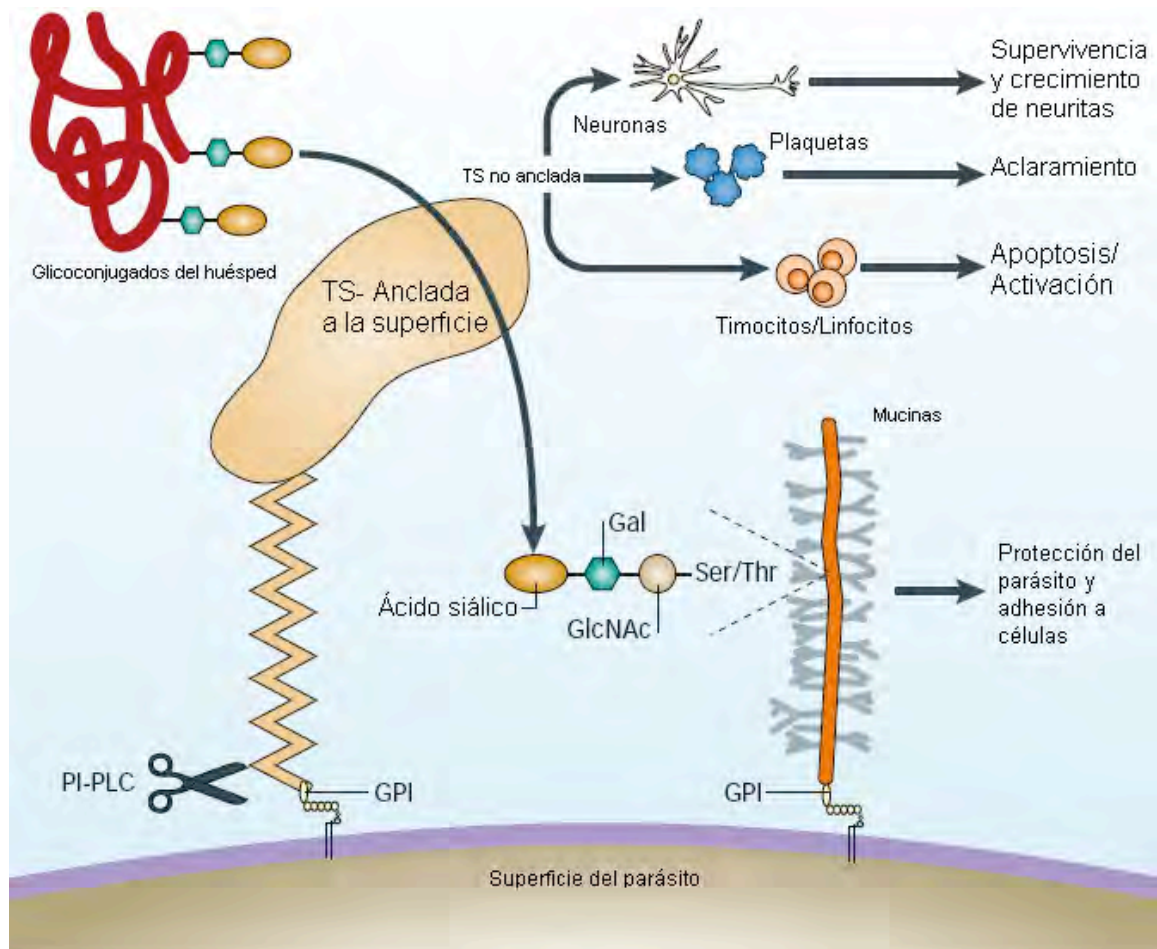


Figura 7. Efectos biológicos de la transialidasa en *Trypanosoma cruzi*. La Figura muestra la sialilación de los O oligosacáridos de las mucinas de tripomastigotos (tGPI mucins, mucins from cell derived tripomastigotos) mediada por la transialidasa (TS, por sus siglas en inglés) asociada a la superficie del parásito. Después del corte desde el GPI, del cual está anclada y por la acción de la enzima fosfolipasa C fosfatidilinositol (PI-PLC, por sus siglas en inglés), TS no anclada al parásito, entra a circulación sanguínea y ejerce varios efectos biológicos en diferentes tipos de células, probablemente alterando su perfil de sialilación. (Gal, galactosa; GlcNAc, N acetilglucosamina; Ser/Thr, residuos de serina o treonina. (Imagen modificada desde: Buscaglia CA, Nat Rev Microbiol, 2006).

1.3 Mecanismos patogénicos de *T. cruzi*.

1.3.1 Inmunosupresión, citocinas y moléculas de adhesión.

Estudios experimentales de la enfermedad aguda (69) y reportes en humanos (70) han mostrado que al igual que otros parásitos, *T. cruzi* altera el sistema inmunológico del hospedero para poder eludir sus mecanismos de defensa. *T. cruzi* disminuye la expresión de las moléculas de superficie CD31, CD41, CD81 en linfocitos (71) favoreciendo la supervivencia del parásito. (La abreviatura CD, “Cluster Differentiation”, por sus siglas en inglés, es una designación que se utiliza para agrupar células del sistema inmune de acuerdo al tipo de moléculas que

expresan en su superficie). Los estudios en biopsias del miocardio de pacientes con miocarditis chagásica crónica han demostrado que el infiltrado inflamatorio está compuesto principalmente de células T, con la predominancia de células T CD8⁺ (71, 72). Higuchi y colaboradores encontraron que las células T CD4⁺ estaban disminuidas en su número comparándolas con las células T CD8⁺ cuya frecuencia se incrementa cuando la presencia de antígenos de *T. cruzi* es abundante, mientras que el número de células T CD4⁺ no cambia bajo estas circunstancias (73). Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que los antígenos de *T. cruzi* juegan un papel fundamental en el desarrollo de miocarditis y que cierto grado de inmunosupresión está presente durante esta fase de la enfermedad. La disminución de células CD4⁺ en presencia de antígenos de *T. cruzi* sugiere que la activación de esta población de células está inhibida o que está presente una falla en el mecanismo de presentación a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (73). La administración de IL-2 restaura la respuesta inmune en la infección experimental por *T. cruzi* (74, 75). La función de IL-2 es permitir la proliferación de células T activadas y mantener una respuesta inmune adecuada, la secreción de IL-2 es dependiente de las señales co-estimuladoras entre las células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés) y las células T que expresan la molécula CD28 que es ligando de las moléculas B7 en las células APC (B7.1 ó CD80, B7.2 ó CD86). Al parecer la respuesta Th2 favorece la permanencia del parásito en el miocardio de la enfermedad crónica chagásica. En contraste, los datos experimentales en ratón (76) mostraron que las células T CD4⁺ y la subpoblación Th2 son responsables del control del parásito y ambas subpoblaciones están involucradas en la respuestas autoinmunes. Los macrófagos son células activas para el control y eliminación de los parásitos por mecanismos oxidativos y no oxidativos. Por otro lado, los macrófagos

quizá sirvan como células hospederas que facilitan la replicación y supervivencia de patógenos. La citocina IL-10 es una citocina con funciones inmunosupresoras regulando la producción de IFN- γ y NO por la disminución de la expresión de antígenos MHC-II en los macrófagos. La neutralización de IL-10 incrementa la resistencia a la infección con ciertos patógenos, incluyendo *T. cruzi*. A pesar de haber una resistencia inicial, los ratones deficientes de IL-10 mueren dentro de la tercera semana de infección con un síndrome tóxico, mediado posiblemente por la sobreproducción sistémica de TNF- α , mientras que los ratones control sobreviven a la infección aguda (77, 78). Esto representa interesantes líneas de investigación que posibilitan nuevos estudios en el futuro. Las moléculas de adhesión son muy importantes para el desarrollo de la inflamación ya que permiten la extravasación y el arribo de células del sistema inmune hacia el sitio donde hay lesión tisular. Aunque el miocardio normal presenta ICAM-1 en las células endoteliales, se ha detectado que esta molécula y la inducción de la expresión de VCAM-1 en capilares y venas de pacientes con CCC están incrementadas. Algunos casos de Miocardiopatías Chagásicas Crónicas también presentan la inducción en la expresión de ICAM-1 en el sarcolema de miocitos, además del endotelio (49). Las moléculas de adhesión parecen estar sobre-expresadas no solo en el miocardio de pacientes con enfermedad de Chagas, sino también en la sangre. Laucella y colaboradores encontraron disminuidos los niveles de algunas moléculas de adhesión en suero después de recibir tratamiento con benzimidazol en niños en la fase indeterminada de la enfermedad de Chagas, sugiriendo que el análisis de estas moléculas podría ser una herramienta valiosa para evaluar el aclaramiento del parásito (79).

Antígenos MHC son también sobre-expresados en pacientes con CCC. Se han detectado en el sarcolema de miocitos una sobre-expresión de moléculas MHC clase I, y existe la evidencia de la sobre-expresión de MHC clase II en células endoteliales de pacientes con CCC (49, 80). Sin embargo es importante subrayar que la sobre-regulación de algunas moléculas de adhesión y los antígenos MHC en los pacientes con CCC, está relacionada con la presencia de miocarditis. En este mismo estudio no se detectó la sobre-expresión de estas moléculas en el miocardio de pacientes con MDI que no tuvieran inflamación del miocardio (49).

1.3.2 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune

La infección por *T. cruzi* desencadena una respuesta inmune compleja. Como patógeno intracelular implica un intricado y no bien entendido mecanismo de interacción de muchos mecanismos humorales y celulares de la inmunidad innata y adaptativa (58). La mayoría de la información concerniente a la inmunidad relacionada con la infección por *Trypanosoma cruzi* se ha obtenido a partir de estudios usando modelos experimentales, particularmente en ratón. Varios hallazgos cruciales se han originado a partir de estudios en ratones con respecto al papel de los mediadores inmunes y células que controlan la infección aguda (cuadro 1) (81). Sin embargo, los estudios experimentales en ratón no han proporcionado una asociación clara con lo que se ha visto en la forma crónica de la enfermedad humana (81).

Cuadro 1. Papel de las citocinas, como mediadores en el control de la infección por *T. cruzi* (81).

Los estudios experimentales en roedores infectados con varias cepas de *T. cruzi* han sido el instrumento para determinar el papel de varias citocinas y los tipos celulares como mediadores en la protección contra la infección aguda por *T. cruzi*. En ratones, durante la fase inicial de la infección, los macrófagos pueden responder a los tripomastigotos de una manera dependiente TLR que señalizan a través de proteínas codificadas por el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide Myd88 (Myd88, por sus siglas en inglés) y producir citocinas como IL-12 y TNF- α que facilitan la polarización de la respuesta de las células T CD4⁺ y CD8⁺ hacia la producción de IFN- γ . El IFN- γ es esencial para el control de la infección y es producido por células CD4⁺ y células CD8⁺. Los macrófagos activados por TNF- α e IFN- γ , se ha visto que tienen un papel importante, controlando el crecimiento del parásito. En varios estudios, se ha visto que el óxido nítrico originado a partir de macrófagos, es relevante para el control del crecimiento del parásito, pero hay evidencia, de que existe un mecanismo independiente del NO después de la infección con ciertas cepas del parásito. Además de los macrófagos, existe un papel claro de las células CD8⁺ y de anticuerpos en el control de la infección aguda. Varias citocinas, especialmente interleucina 10 (IL-10, por sus siglas en inglés) e interleucina 4 (IL-4, por sus siglas en inglés) tienen un papel importante controlando la respuesta inmune predominantemente Th1 (por sus siglas en inglés) contra *T. cruzi*. IL-10 e IL-4 podrían interferir con la habilidad del huésped para tratar con la infección pero se ha visto que estas citocinas también previenen la inflamación excesiva indeseada en el tejido. Es claro que el control efectivo de la infección puede ser solo cuando las células interactúan y se activan entre sí en el microambiente apropiado. Las quimiocinas tienen un papel esencial en el tráfico de leucocitos y estudios recientes demostraron que *T. cruzi* puede inducir la producción de quimiocinas por macrófagos de una manera dependiente de TLR-2 *in vivo* e *in vitro*. Por otra parte, subclases específicas de quimiocinas son producidas durante la infección y se ha visto que facilitan el desarrollo del infiltrado inflamatorio que eventualmente controla la infección. Por ejemplo, los ratones que son deficientes para el receptor de quimiocina C-C tipo 5 (CCR5, por sus siglas en inglés) no pueden montar una respuesta inflamatoria efectiva y por lo tanto sucumben a la infección por *T. cruzi*. Por lo tanto la habilidad del parásito para inducir la producción de quimiocinas, así como TNF- α e IL-12 por macrófagos, facilita la migración y activación de células T CD4⁺ y T CD8⁺ capaces de producir IFN- γ . El IFN- γ producido es requerido por los macrófagos para matar a los parásitos. Más aún, el IFN- γ modula la producción de quimiocinas y regula el desarrollo apropiado de la respuesta inflamatoria ante la infección. Esta respuesta inflamatoria es necesaria para el control del parásito, pero puede ocurrir una inflamación excesiva y descontrolada del corazón (81).

1.3.3 Respuesta inmune humoral.

La primera barrera que el parásito encuentra después de entrar al hospedador son moléculas y células efectoras de la inmunidad innata y estas juegan un papel muy importante en la repuesta inmunológica contra *T. cruzi*.

Después de romper la barrera de la piel el parásito entra en la sangre y tejidos e inicia la respuesta temprana del complemento y las proteínas de fase aguda (proteína C reactiva, componente amiloide P del suero). Estas moléculas se unen a *T. cruzi* y median su endocitosis. También macrófagos y células dendríticas expresan en su superficie el receptor de manosa, que reconoce carbohidratos de *T.*

cruzi con patrones moleculares que no se encuentran en las células del hospedero (58).

En los macrófagos *T. cruzi* desencadena una diversidad de interacciones moleculares que inmovilizan la respuesta de inmunidad innata del hospedero (Figura 8). Los macrófagos secretan IL-12 que activa a las células NK para producir IFN- γ (82), esta citocina actúa recíprocamente en macrófagos que liberan TNF- α para actuar sinérgicamente con IL-12 e IFN- γ e inducir la producción de NO en estas células (Figura 8) (83, 84). Sin embargo hay varias evidencias que apoyan el hecho de que la respuesta inflamatoria está autoregulada y que la activación del macrófago y la producción de NO está reducida por citocinas antiinflamatorias. Se ha encontrado que la IL-10 se requiere para prevenir una respuesta excesiva pro-inflamatoria durante la infección por *T. cruzi* (84-86). También se ha reportado algo similar con el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés), ya que esta citocina es producida durante la infección experimental en ratones, siendo un potente inhibidor de los efectos de citocinas secretadas por macrófagos activados *in vivo* e *in vitro*, jugando así un papel clave en la regulación de infección (87). Se ha propuesto que IL-4, regula negativamente al IFN- γ y también la inflamación cuando coopera con IL-10 (88), pero algunos otros reportes mostraron que esta citocina tiene efectos similares a los del IFN- γ , como por ejemplo la acción tripanocida (89, 90). Mientras que el papel de la interleucina 13 (IL-13, por sus siglas en inglés) aún no es claro, se ha reportado que esta citocina podría estar involucrada en la regulación de la secreción de IFN- γ (91).

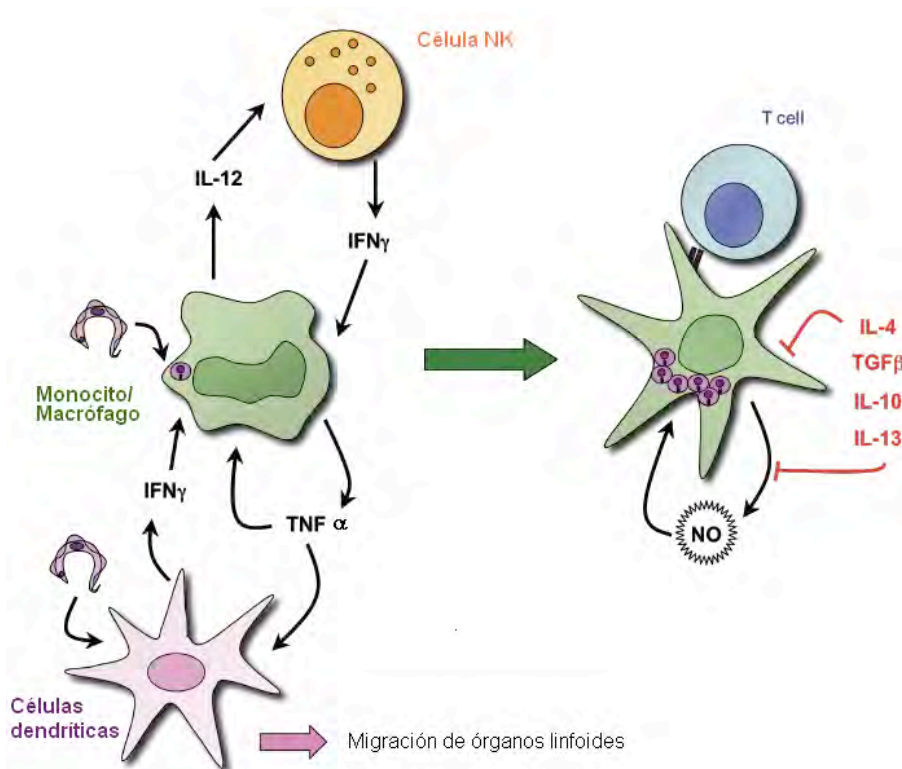


Figura 8. Esquema de la respuesta inmune innata a *Trypanosoma cruzi*. (Imagen modificada desde: Grajal, Tesis doctoral, 2008). Los macrófagos secretan IL-12 que activa a las células NK para producir IFN- γ (82), esta citocina actúa recíprocamente en macrófagos que liberan TNF- α para actuar sinérgicamente con IL-12 e IFN- γ e inducir la producción de NO en estas células.

Las células presentadoras de antígeno (APCs, por sus siglas en inglés) no son las únicas células capaces de presentar péptidos del parásito, la habilidad de *T. cruzi* para invadir un alto número de diversos tipos de células en el mamífero, las involucra en respuestas inmunes e inflamatorias. Se ha demostrado que los cardiomiocitos tienden a responder a la infección liberando NO, citocinas y quimiocinas (92, 93).

1.3.4 Respuesta inmune celular.

La respuesta inmune contra *T. cruzi* involucra también la activación de componentes celulares de la respuesta adaptativa (Figura 9). La infección experimental aguda en modelo murino, desencadena una activación intensa y policlonal de linfocitos B, lo que implica una sobreproducción de inmunoglobulinas. La respuesta contra

antígenos del parásito en esta fase, representa solo a una fracción muy pequeña del total de las inmunoglobulinas producidas (94). Esta respuesta policlonal es ampliamente dependiente de células T CD4⁺ (94).

Ya se ha establecido la importancia en el control de la infección por las dos subpoblaciones principales de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. *T. cruzi* es capaz de infectar cualquier tipo de células en el hospedero (95); después de que el parásito ha escapado de la vacuola parasitófora, los antígenos del parásito son procesados y presentados en el contexto de moléculas MHC clase I, las cuales son reconocidas por células efectoras CD8⁺ (96). Por otro lado, parásitos muertos, antígenos solubles del parásito, o parásitos que no lograron escapar de la vacuola parasitófora son presentados solo por células APCs a través de moléculas MHC clase II a las células CD4⁺ (97), las cuales cooperan con las células B para inducir la producción de anticuerpos (97). Por otra parte, a pesar de que ratones deficientes de células B sucumben a la infección (98), la respuesta inmune parece ser en mayor medida dependiente en células CD8⁺ que producen IFN- γ (98). Las células T CD8⁺ citotóxicas pueden controlar la infección eliminando las células infectadas a través de las proteínas líticas perforina/granzima (98). Sin embargo, hay reportes que indican que las células T CD8⁺ no controlan completamente la infección debido que se convierten en células no responsivas (99).

Las citocinas tienen un papel clave regulando tanto la inducción como el tipo de respuesta inmune, pero no se ha visto una polarización Th1 vs. Th2 contundente en estudios experimentales en ratones susceptibles o resistentes a retos antigénicos contra *T. cruzi* (100-102). Espinoza y colaboradores demostraron que el tipo de citocinas que se secretan durante la infección por *T. cruzi* en modelo experimental

en ratón depende del tipo de cepa del parásito y varía de acuerdo al grado de virulencia de la cepa (103).

También se ha propuesto que una variedad de quimiocinas juegan un papel clave en la infección (87, 104). El receptor de quimiocina CCR5 y su ligando juegan un papel clave en la migración de células T hacia el corazón (105) y en la proliferación del parásito (106). Las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 no afectan la migración leucocitaria pero cuando son bloqueadas con anticuerpos neutralizantes da como resultado una disminución en la carga parasitaria en el corazón (107).

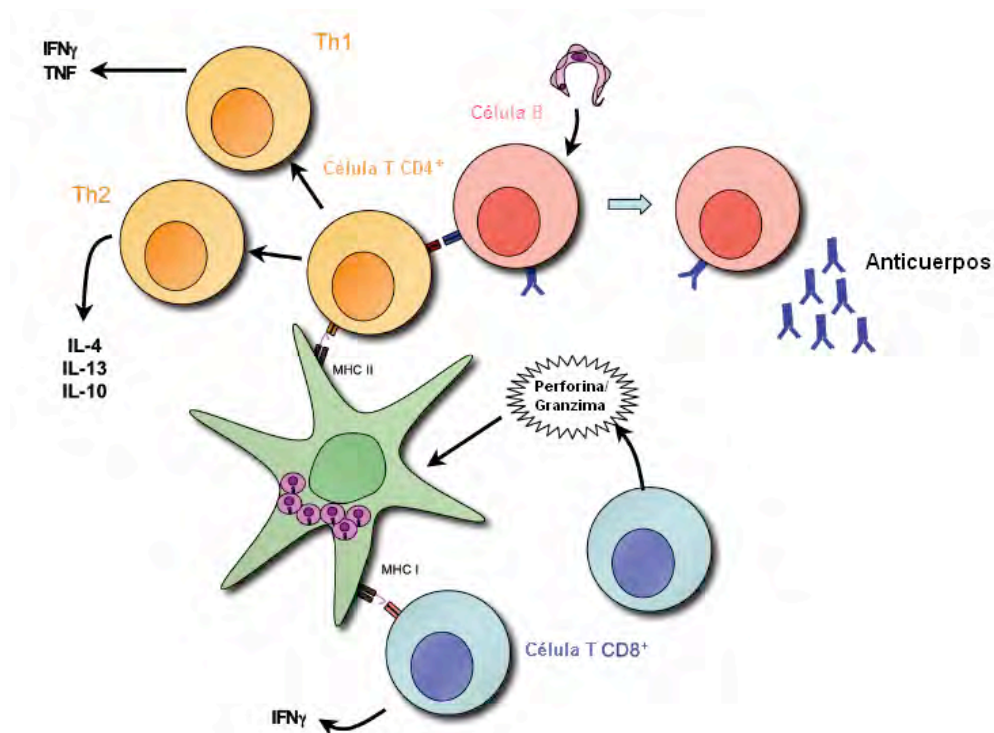


Figura 9. Esquema de la respuesta inmune adaptativa a *Trypanosoma cruzi*. Las células presentadoras de antígeno activan a las células CD4+ y CD8+ lo que permite la secreción de citocinas IFN-γ y TNF por parte de las células Th1 y las células T CD8+. Las células Th2 secretan IL-4, IL-13, IL-10 al ser activadas por las células presentadoras de antígeno. Los linfocitos B son activados y secretan altas cantidades de anticuerpos. (Imagen modificada desde: Grajal, Tesis doctoral, 2008)

1.4 Células supresoras de origen mieloide (MDSCs).

Las células supresoras de origen mieloide (MDSC) fueron descritas hace más de 20 años en pacientes con cáncer, pero su importancia funcional en el sistema inmune ha sido apreciada recientemente. Las características que son comunes para estos tipos celulares son, su origen mieloide, su estado inmaduro y la habilidad para suprimir la respuesta de células T (Cuadro 2) (108). Además de sus efectos supresores en la respuesta inmune adaptativa, se ha reportado que las MDSCs regulan la respuesta inmune innata modulando la producción de citocinas en macrófagos (109). También se han descrito funciones no inmunes de las MDSCs, tales como angiogénesis tumoral y metástasis (110).

Cuadro 2. Definición de las Células Supresoras de Origen Mieloide (108).

- Son una población heterogénea de células de origen mieloide que comprende células progenitoras mieloides y macrófagos inmaduros, granulocitos inmaduros y células dendríticas inmaduras.
- Están presentes en un estado activado que es caracterizado por el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y de arginasa 1.
- Son potentes supresoras de varias funciones de células T.
- En ratones el fenotipo de las MDSCs es CD11b⁺, GR1⁺, aunque se han identificado subgrupos funcionalmente distintos dentro de estas poblaciones.
- En humanos el fenotipo de las MDSCs es LIN⁺(CD3⁻CD16⁻CD56⁻CD19⁻CD20⁻), CD33⁺, CD11b⁺, CD14⁺, las células humanas no presentan un marcador homólogo al GR1 del ratón. También identificadas dentro de poblaciones CD15⁺ en sangre periférica de humanos.
- En un estado inactivo las células mieloides inmaduras carecen de actividad supresora y están presentes en la médula ósea pero no en órganos linfoides secundarios.
- La acumulación de MDSCs en órganos linfoides y en tumores en respuesta a varios factores de crecimiento y citocinas está asociado con severas condiciones patológicas (la mayoría cáncer).
- En tejidos tumorales, las MDSCs pueden distinguirse de macrófagos asociados a tumores (TAMs, por sus siglas en inglés) por su alta expresión de GR1 (no expresados en TAMs), por su baja expresión de F4/80 (expresado por TAMs), debido a que una proporción grande de MDSCs tiene una morfología granulocítica, basado en la sobreexpresión de arginasa 1 y óxido nítrico sintasa (no expresado por TAMs).

Las MDSCs consisten en células progenitoras mieloides y células mieloides inmaduras (IMCs). En individuos sanos se están generando en médula ósea y se diferencian en granulocitos maduros, macrófagos o células dendríticas. En contraste, en condiciones patológicas, tales como cáncer, varias enfermedades infecciosas, sepsis, trauma, trasplante de médula ósea y algunas enfermedades autoinmunes, una población parcial de las IMCs que no se diferencian en células maduras, resulta

en la expansión de esta población de MDSCs. La activación de las IMCs en condiciones patológicas resulta en la sobreexpresión de factores supresores inmunes, tales como la arginasa 1 y la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS; también conocida como NOS2), así como también un incremento en su producción de NO y especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (108).

1.4.1 Origen y subgrupos de MDSCs.

Las MDSCs que se expanden en condiciones patológicas, son una población heterogénea mieloide inmadura que ha sido impedida para madurar y carece de la expresión de marcadores de superficie celular que son específicamente expresados por monocitos, macrófagos o células dendríticas, y comprenden una mezcla de células mieloides que tienen la morfología de granulocitos o monocitos (111) (Figura 10).

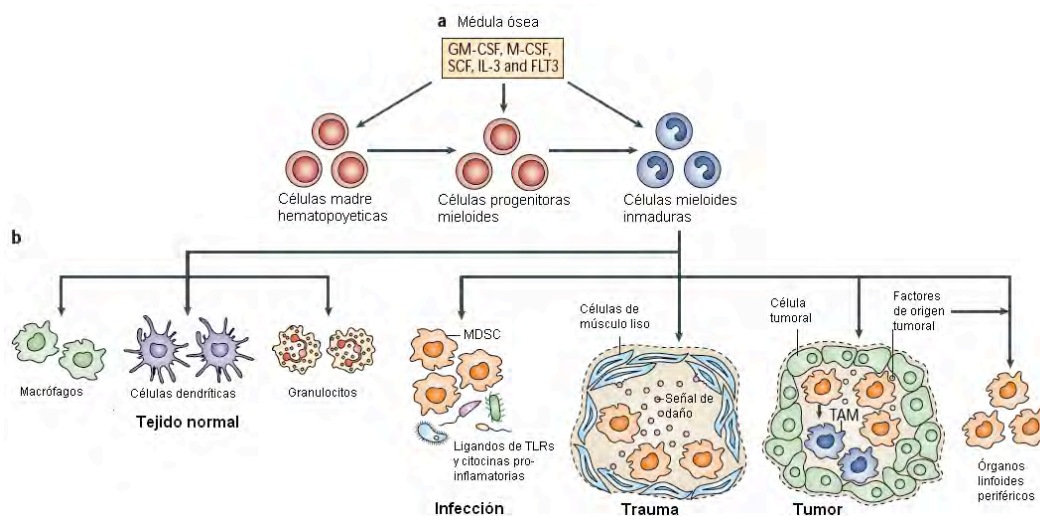


Figura 10. / El origen de MDSCs. / **a)** Las células mieloides inmaduras son parte de del proceso normal de mielopoyesis, el cual tiene lugar en la médula ósea y es controlado por una red compleja de factores solubles, incluyendo citocinas, tales como factor estimulador de colonias de macrófagos/granulocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), factor celular troncal (SCF, por sus siglas en inglés), IL-3 y Tirosin cinasa receptora tipo 3, (FLT3, por sus siglas en inglés). Las células madre hematopoyéticas se diferencian en células progenitoras mieloides comunes y luego en células mieloides inmaduras. **b)** Normalmente las células mieloides inmaduras migran a órganos periféricos, donde se diferencian en macrófagos, células dendríticas o granulocitos. Sin embargo, los factores que son producidos durante infecciones agudas o crónicas, trauma o sépsis y en microambiente tumoral, promueven la acumulación de las células mieloides inmaduras en estos sitios, impidiendo su diferenciación e induciendo su activación. Estas células presentan funciones inmunosupresoras y por lo tanto son conocidas como células supresoras de origen mieloide. Las MDSCs se acumulan también en órganos linfoides periféricos en respuesta a factores de origen tumoral. Estas células pueden también diferenciarse en TAMs dentro de un microambiente tumoral; el fenotipo y función de TAMs es distinto de aquel expresado por las MDSCs. (Imagen modificada desde: Gabrilovich, Nat Rev Immunol, 2009).

Los primeros estudios mostraron que el 1-5% de MDSCs pueden formar colonias celulares mieloides (112-114) y que cerca de un tercio de esta población puede diferenciarse en macrófagos maduros y células dendríticas en la presencia de las citocinas apropiadas *in vivo* e *in vitro* (112). En ratones, las células supresoras de origen mieloides están caracterizadas por la co-expresión del antígeno de diferenciación de linaje celular mieloides GR1 y CD11b (α M-integrina) (115). La médula ósea normal de ratón contiene 20-30% de células con este fenotipo, pero estas células constituyen sólo una pequeña proporción (2-4%) de las células del bazo y están ausentes de los ganglios linfáticos. En humanos las MDSCs se definen como células CD14⁻CD11b⁺ o más estrictamente como células que expresan el marcador común de células mieloides CD33, pero carecen de la expresión de marcadores de células linfoides o mieloides maduras, y de moléculas de MHC clase II, HLA-DR (116, 117). Las células supresoras de origen mieloides también han sido identificadas dentro de una población CD15⁺ en sangre periférica humana (118). En individuos sanos, las células mieloides inmaduras constituyen ~0.5% de las células mononucleares de sangre periférica (108).

Recientemente, se ha definido de manera más precisa la heterogeneidad morfológica de MDSCs en ratones, basado en parte en su expresión de GR1.

Los anticuerpos específicos para GR1, se unen a dos epítopos, LY6G y LY6C (codificados por genes diferentes), cada uno de los cuales puede ser detectado por separado, a través del uso de anticuerpos. El uso de estos anticuerpos epítipo-específicos llevó a la identificación de dos subclases de células supresoras de origen mieloides: las MDSCs granulocíticas que tienen un fenotipo CD11b⁺LY6G⁺LY6C^{low} y aquellas con morfología monocítica con un fenotipo CD11b⁺LY6G⁻LY6C^{hi} (111). Existe evidencia que indica que estas dos subclases quizá tengan funciones

diferentes en cáncer, infección y en enfermedades autoinmunes (119, 120). Durante el análisis de 10 diferentes modelos experimentales tumorales, se encontró que ambas subclases se expanden, pero en la mayoría de los casos, la expansión de las MDSCs granulocíticas fue mucho mayor que la subclase monocítica (111). Las dos subclases de MDSCs usan mecanismos diferentes para suprimir la función de células T y la habilidad para diferenciarse en células dendríticas y macrófagos maduros *in vitro* se ha descrito sólo para las MDSCs monocíticas (111).

En humanos las células supresoras de origen mieloide CD34⁺, fueron reportadas por primera vez en pacientes con cáncer de cabeza y cuello en 1995. En contraste a las MDSCs de murino, las cuales son definidas por la expresión de la molécula Gr-1 y CD11b, la células correspondientes en humanos son caracterizadas inadecuadamente debido a la falta de marcadores uniformes. Se ha reportado un incremento en la frecuencia de células mieloides inmaduras Lin⁻CD33⁺CD34⁺CD15⁺ con funciones supresoras en sangre periférica de pacientes con cáncer de cuello y cabeza mientras que otros investigadores han reportado la función supresora de granulocitos CD15⁺. En estudios posteriores, las MDSCs que expresaban arginasa-1, fueron definidas como células CD11b⁺CD14⁺CD15⁺HLA⁻DR⁻, las cuales estuvieron presentes en sangre periférica de pacientes con cáncer renal (121). De manera similar, se ha observado un incremento en la frecuencia de células Lin⁻HLA⁻DR⁻CD33⁺ en pacientes con cáncer renal. Basándose en las observaciones de *Ormandy y colaboradores*, a cerca del daño en la función de células dendríticas mieloides CD1c⁺CD19⁻CD14⁻ en pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés hepatocellular carcinoma), *Greeten y colaboradores*, analizaron la función de células dendríticas generadas *in vitro* desde pacientes con HCC, las cuales se originaron a partir de monocitos CD14⁺ y lo que observaron fue que la función de

estas células dendríticas estaba dañada cuando se compararon con las células dendríticas generadas *in vitro* a partir de sujetos sanos. Análisis subsecuentes demostraron que un subtipo de monocitos CD14⁺, células CD14⁺HLA⁻DR^{low/neg}, no maduraban en células dendríticas funcionales y por lo tanto fallaban para inducir una respuesta inmune adecuada. En base a los estudios iniciales, las MDSCs han sido analizadas en otros diferentes tipos tumorales, caracterizando así su fenotipo (Tabla 1) (121).

Tabla 1. Fenotipos de MDSCs en patologías humanas. HNSCC, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.

Fenotipo	Tipo de Enfermedad
Lin ⁻ HLA ⁻ DR ⁻	HNSCC, Cáncer pulmonar y Cáncer de mamá (N=93)
Lin ⁻ HLA ⁻ DR ⁻ CD33 ⁺	Cáncer renal (N=18)
Lin ⁻ HLA ⁻ DR ⁻ CD33 ⁺	Melanoma (N=39)
Lin ⁻ HLA ⁻ DR ⁻ CD33 ⁺	Cáncer renal (N=9)
Lin ^{-/Low} HLA ⁻ DR ⁻ CD33 ⁺ CD11b ⁺	Cáncer de mama (N=17)
CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD33 ⁺	HNSCC (N=14) y (N=5)
CD33 ⁺ HLA ⁻ DR ⁻	Cáncer Renal (N=23)
CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺	Cáncer Renal (N=123)
CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺	Cáncer Renal (N=27)
CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺ CD33 ⁺	HNSCC (N=87)
CD11b ⁺ CD33 ⁺	Cáncer Pulmonar (N=10)
CD11b ⁺	Infección con virus de influenza A
CD15 ⁺ CD14 ⁻	Cáncer Renal (N=23)
CD15 ⁺ IL4R α ⁺	Melanoma (N=14); Colon (N=15)
CD14 ⁺ HLA ⁻ DR ^{Low/neg}	Mieloma múltiple (N=76)
CD14 ⁺ HLA ⁻ DR ^{Low/neg}	Melanoma (N=16)
CD14 ⁺ HLA ⁻ DR ^{Low/neg}	Enfermedades intestinales inflamatorias

Tabla modificada desde Greten, *Int Immunopharmacol*, 2011.

1.4.2 MDSCs en condiciones patológicas.

Las MDSCs fueron caracterizadas inicialmente en ratones con tumores y pacientes con cáncer. Se ha demostrado que estas células se expanden sistemáticamente cuando los ratones son inoculados con células tumorales trasplantadas y cuando los tumores se desarrollan espontáneamente en ratones transgénicos con expresión de

oncogenes en tejidos. Se ha detectado también un incremento en el número de las MDSCs de hasta 10 veces en sangre de pacientes con diferentes tipos de cáncer (116, 117, 122). En varios modelos tumorales de ratón, del 20 al 40% de los esplenocitos son MDSCs (en contraste con el 2-4% visto en ratones sanos). Además, las MDSCs se encuentran en tejidos tumorales y en los ganglios linfáticos de ratones con tumores (108).

Aunque las observaciones iniciales y la mayoría de la información disponible sobre el papel de las células supresoras de origen mieloide en la respuesta inmune proviene de estudios en cáncer, se ha informado que éstas también regulan la respuesta inmune durante infecciones bacterianas y parasitarias, inflamación aguda y crónica, estrés traumático, sepsis y trasplantes (108).

Se ha observado también una expansión sistemática tanto de la subclase granulocítica como de la monocítica en ratones estimulados con *Mycobacterium tuberculosis*. Además la infección aguda por *T. cruzi*, la cual induce la activación de células T e incrementa la producción IFN- γ , lleva también a la expansión de las células supresoras de origen mieloide (69, 123). Se ha informado acerca de una expansión similar de las MDSCs durante la toxoplasmosis aguda, sepsis poli-microbiana, infección aguda con *Listeria monocytogenes*, infección crónica con *Leishmania major* e infección aguda con helmintos, *Candida albicans* o *Porphyromonas gingivalis* (108).

La expansión de las MDSCs está asociada también con autoinmunidad e inflamación. En encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE, por sus siglas en inglés), un modelo de esclerosis múltiple de ratón, se observó un incremento en el número de MDSCs (específicamente la subclase monocítica CD11b⁺LY6G⁻LY6C^{hi}) en sangre y bazo, y se encontró que estas células entraron al sistema nervioso

central durante la fase inflamatoria de la enfermedad. Finalmente se ha observado también un incremento transitorio significativo en el número de MDSCs en ratones sanos después de inmunizarlos con diferentes antígenos, incluyendo ovoalbúmina o péptido junto con adyuvante completo de Freund (CFA, por sus siglas en inglés), vacuna recombinante de virus o enterotoxina A de estafilococo. En base a todas las observaciones mencionadas, es claro que una población inmunosupresora de MDSCs frecuentemente se expande en muchas condiciones patológicas (108).

1.4.3 Expansión y activación.

Diversos estudios han mostrado que la expansión y activación de las MDSCs involucra a diversos factores como la ciclooxigenasa 2 (conocida también como prostaglandina endoperoxido sintasa 2, (PTGS2, por sus siglas en inglés), prostaglandinas, factor de células madre (SCF, por sus siglas en inglés), interleucina 6, IL-10, IL-12 e IL-13 (IL-6, por sus siglas en inglés), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), factor estimulante de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés) (108, 114, 124, 125). La mayoría de estos factores desencadenan en las MDSCs vías de señalización que convergen en los miembros de la familia de proteínas cinasas Janus (JAK, por sus siglas en inglés) y en el activador de la transcripción y transductor de señal 3 (STAT 3, por sus siglas en inglés) las cuales son moléculas de señalización que están involucradas en la supervivencia celular, proliferación diferenciación y apoptosis (108) (Figura 11).

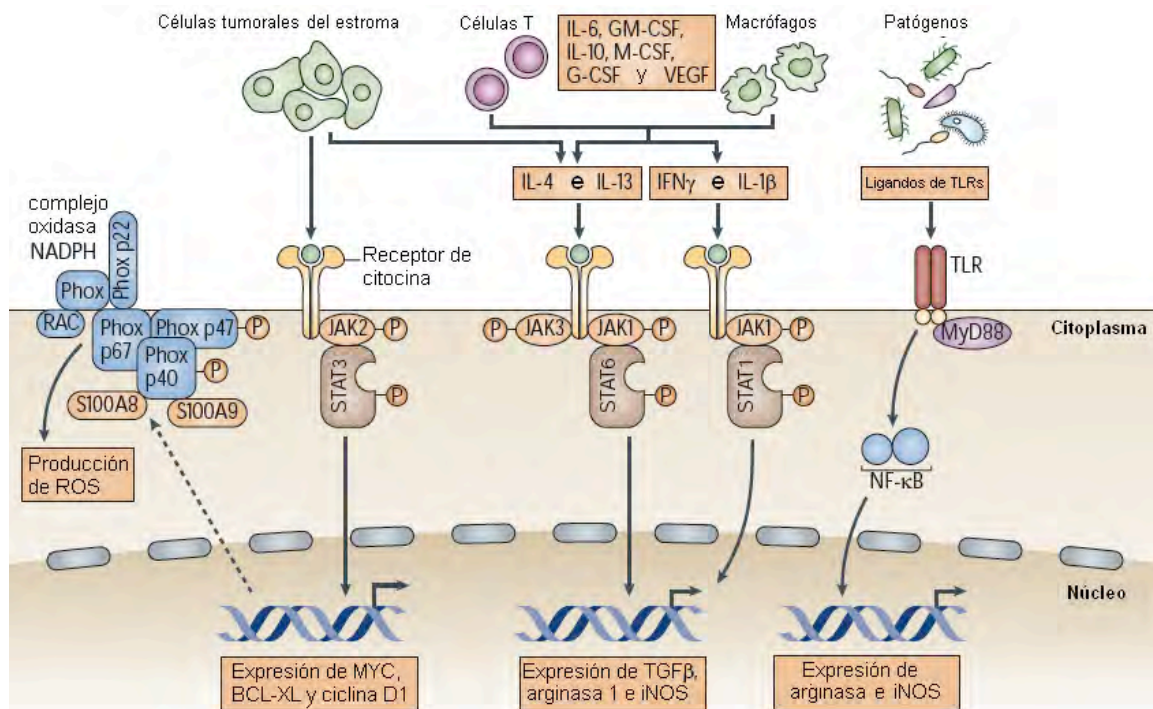


Figura 11. Vías de señalización involucradas en la expansión de las MDSCs. La acumulación de las MDSCs está regulada por varios factores que son liberados por células tumorales, células del estroma, células T activadas y macrófagos, células tumorales apoptóticas, agentes virales y bacterianos y células infectadas por patógenos. Estos factores (IL-6, GM-CSF, IL-10, M-CSF, G-CSF y VEGF) desencadenan diferentes vías de señalización en las MDSCs que involucran, principalmente, a la familia de moléculas activadoras de la transcripción y transductores de señales (STATs, por sus siglas en inglés). STAT 3, regula la expansión de las MDSCs, estimulando la mielopoiesis e inhibiendo la diferenciación de células mieloides y promoviendo la supervivencia de las MDSCs a través de factores transcripcionales como MYC (factor transcripcional que es codificado por el protooncogen *Myc*) y proteínas que inhiben la apoptosis, como la proteína XL del linfoma de células B (BCL-XL, por sus siglas en inglés) y ciclina D. STAT-3, contribuye también en el incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las MDSCs. La activación de STAT-6 y STAT-1, así como de la activación del factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$, por sus siglas en inglés) mediada por receptores tipo Toll, resulta en la activación de las MDSCs, lo que lleva a estas células a la sobre-regulación de las enzimas arginasa 1 y óxido nítrico sintasa inducida (iNOS o NOS2), así como al incremento en la producción de citocinas supresoras como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). Las proteínas de unión al calcio S100 (S100A8 y S100A9) se unen directamente a componentes del complejo NADPH. Esta unión potencia la activación del complejo oxidasa NADPH en las MDSCs, lo que causa un incremento en la producción ROS, y por ende de la actividad supresora observada. Abreviaturas en inglés: G-CSF, granulocyte colony stimulating factor (factor estimulante de colonias de granulocitos); GM-CSF, granulocyte/Macrophages CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos); IFN- γ , interferon- γ (interferón gamma); IL, interleukin (interleucina); JAK, Janus kinase (quinasas Janus); MyD88, myeloid differentiation primary-response gen 88 (gen de respuesta primaria para diferenciación mieloide que codifica para una molécula adaptadora del receptor tipo Toll); Phox, phagocyte oxidase (); VEGF, vascular endothelial growth factor (factor de crecimiento endotelial vascular). (Imagen modificada desde: Gabrilovich, Nat Rev Immunol, 2009).

La molécula STAT 3 posiblemente es el principal factor transcripcional que regula la expansión de las MDSCs. Las MDSCs de ratones con tumores, tienen niveles incrementados de STAT3 fosforilado comparado con ratones sanos silvestres (126). La exposición de células progenitoras a los sobrenadantes de cultivos de células tumorales resultó en la activación de JAK 2 y STAT 3 lo que se asocia a la expansión de MDSCs *in vitro*. Sin embargo, esta expansión fue derogada cuando se inhibió la expresión de STAT3 en las células hematopoyéticas progenitoras (126,

127). La ablación en la expresión de STAT3 reduce la expansión de las MDSCs e incrementa la respuesta de células T en ratones con tumores. Por lo tanto, la activación anormal y persistente de STAT3 en células progenitoras mieloides previene su diferenciación en células mieloides maduras, promoviendo la expansión de las MDSCs (108, 126, 127).

Hallazgos recientes sugieren que STAT3 regula también la expansión de las MDSCs, induciendo la expresión de las proteínas “A” de unión al calcio S100A8 y S100A9, receptores que están expresados también en la superficie de las MDSCs. Las proteínas S100A8 y S100A9 pertenecen a la familia de proteínas S100 de unión al calcio y tienen un papel importante en la inflamación (128). La sobreexpresión dependiente de STAT3 de las proteínas S100A8 y S100A9, en células progenitoras mieloides de bazo de ratones con tumores y de ratones transgénicos *naive* que sobre expresan la proteína S100A9, se previene su diferenciación y resulta en la expansión de MDSCs. Por contraste, las MDSCs no se expanden en sangre periférica ni en bazo de ratones que son deficientes en la expresión de la proteína S100A9 cuando se les reta antigénicamente con células tumorales o con CFA (129). En otro estudio se mostró que las proteínas S100A8 y S100A9 promueven la migración de las MDSCs hacia sitios tumorales a través de la unión de receptores N-glicanos carboxilados, presentes en las MDSCs (130).

1.4.4 Mecanismos de activación.

En la actualidad es claro que la actividad supresora de las MDSCs requiere no solo de factores que promuevan su expansión, sino también de factores que induzcan la activación de las MDSCs. La expresión de estos factores, los cuales son producidos principalmente por células T y células tumorales del estroma, es inducida por

diferentes productos virales y bacterianos o como resultado de la muerte de células tumorales (131). Estos factores, incluidos el IFN- γ , los ligandos TLRs, IL-4, IL-13 y el factor de crecimiento transformante- β (TGF β , por sus siglas en inglés transforming growth factor- β), activan varias vías de señalización en las MDSCs que involucran a STAT6, STAT1 y al factor nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$, por sus siglas en inglés nuclear factor- $\kappa\beta$) (108).

El bloqueo de IFN- γ , el cual es producido por células T activadas, impide la supresión de células T mediada por las MDSCs. La molécula STAT1 es el principal factor transcripcional que es activado por señalizaciones mediadas por el IFN- γ y está involucrada en la sobre regulación de arginasa1 e iNOS y por las MDSCs en un microambiente tumoral. Además las MDSCs de ratones Stat1^{-/-} fallan para sobre regular la expresión de arginasa-1 e iNOS, por lo tanto no inhiben la respuesta de las células T. En consistencia con otros hallazgos, el IFN- γ que es producido por células T activadas y el iNOS expresado en las MDSCs en interacción con la actividad de la IL-4 y arginasa-1 (20), todos se han implicado en la función supresora de las MDSCs (108, 124).

En diversos estudios se ha demostrado un papel importante del receptor- α de la IL-4 (IL4R α) y STAT6 para la vía de señalización corriente abajo en las MDSCs. La activación de la vía de señalización del IL4R α por su ligando interleucina 4, induce la expresión de arginasa-1 en aislados o en líneas clonadas de MDSCs. Además se ha reportado que la IL-4 e IL-13 sobre regulan la actividad de la arginasa-1, la cual incrementa la actividad supresora de las MDSCs. Otros experimentos han demostrado que la deficiencia de STAT6 previene la señalización río abajo del IL4R α y por lo tanto bloquea la producción de arginasa-1 por MDSCs. Por otra parte, se ha reportado que la vía IL-4R α -STAT6 está involucrada en la inducción

dependiente de IL-13 para producir TGF- β en las MDSCs de ratones con sarcoma, lo cual resulta en la disminución de la inmunovigilancia. Sin embargo, en un modelo de cáncer de mama, los ratones deficientes en IL-4R α mantuvieron altos niveles de MDSCs en el bazo, después de la extracción quirúrgica de los tumores mamarios. En un estudio que evaluó el papel del TGF- β (pero no el del IL4R α), anticuerpos de bloqueo, específicos para TGF- β , no revirtieron la anergia de las células T en un linfoma de células B *in vitro*. Estos datos, colectivamente, indican que la vía de señalización IL4-STAT6 podría no estar involucrada en la inmunosupresión de todos los modelos tumorales (108).

Los receptores tipo Toll tienen un papel central en la activación de la respuesta inmune innata. La sepsis poli-microbiana que es inducida por la sutura o por los puntos quirúrgicos en una región específica del intestino grueso (ciego) y la cual libera productos microbianos dentro del peritoneo y hacia la circulación sistémica, resulta en la expansión de la población de MDSCs en el bazo. La expansión de las MDSCs es dependiente de la molécula adaptadora del TLR (MyD88) (131). Sin embargo, ratones silvestres y ratones que carecían de una proteína TLR4 funcional, tuvieron una expansión de la población de MDSCs durante la sepsis poli-microbiana. Esto sugiere que la señalización a través del TLR4 no se requiere para la expansión de las MDSCs y que la vía de señalización dependiente de MyD88 que es desencadenada por otros TLRs probablemente contribuye a la expansión de las MDSCs en condiciones de sepsis (117). Estas observaciones indican que la activación de las MDSCs es un resultado básico de la respuesta inmune a los patógenos que expresan los ligandos de los TLRs (108).

Es importante notar que un incremento en la generación y reclutamiento de IMCs en el contexto de enfermedades infecciosas agudas o después de la administración de

vacunas, no refleja necesariamente la expansión de una subpoblación de MDSCs. Es probable que bajo condiciones patológicas, la expansión de la población de MDSCs, está regulada por dos diferentes grupos de factores: aquellos que inducen la expansión de una población de MDSCs y aquellos que inducen su activación. Este sistema de dos niveles puede permitir la flexibilidad en la regulación de estas células bajo condiciones fisiológicas y patológicas (108).

1.4.5 Mecanismos de supresión.

La mayoría de los estudios han mostrado que la actividad inmunosupresora de las MDSCs requiere del contacto célula-célula, lo que sugiere que las MDSCs funcionan a través de sus receptores celulares de superficie y/o a través de la secreción de mediadores solubles de vida corta (108).

Históricamente, la actividad de las MDSCs se ha asociado con el metabolismo de la L-arginina que sirve de sustrato para dos enzimas, iNOS (que genera NO) y arginasa 1 (que convierte L-arginina a urea y ornitina).

Las MDSCs expresan altos niveles de arginasa e iNOS y ambas enzimas tienen un papel directo en la inhibición de la función de las células T. Datos recientes sugieren que hay una correlación cercana entre la disponibilidad de la L-arginina y la regulación de la proliferación de las células T (117). La actividad incrementada de la arginasa 1 en MDSCs lleva al aumento del catabolismo de la L-arginina, lo que agota a este aminoácido no esencial en el microambiente. La escasez de la L-arginina inhibe la proliferación de células T a través de diferentes mecanismos, incluida la disminución en la expresión de la cadena ζ del CD3.

El NO suprime la función de las células T a través de varios mecanismos que involucran la inhibición de la función de JAK3 y STAT5 en las células T. La inhibición en la expresión del MHC clase II y la inducción de apoptosis en las células T (108). Otro factor importante que contribuye en la actividad supresora de las MDSCs son las ROS. La producción incrementada de ROS se ha convertido en una de las características principales de las MDSCs de pacientes con cáncer y de ratones que alojan tumores (111, 115, 118). La inhibición en la producción de ROS en aislados de MDSCs de pacientes con cáncer y ratones que alojaban tumores, elimina los efectos supresores de estas células *in vitro*. Curiosamente, se ha demostrado que, la unión de las integrinas que son expresadas en la superficie de las MDSCs, contribuye a la producción incrementada de ROS, después de la interacción de las MDSCs con las células T (115). Además varios factores conocidos de origen tumoral como TGF- β , IL-3, IL-6, IL-10, el factor de crecimiento de origen plaquetario y GM-CSF, pueden inducir la producción de ROS por las MDSCs. La participación de ROS y NO en la actividad supresora de MDSCs no está restringida a condiciones neoplásicas. Además, productos microbianos e inflamatorios son conocidos también como inductores del desarrollo de MDSCs que producen ROS y NO, después de su interacción con células T activadas (119); existen hallazgos similares en modelos de EAE y toxoplasmosis aguda (120). Se ha observado que MDSCs median su función supresora a través de la producción de NO dependiente de IFN- γ , en un modelo experimental de *T.cruzi* (69).

Recientemente, se encontró que el peroxinitrito es un mediador crucial para la supresión ejercida por las MDSCs sobre la función las células T. Este compuesto es el producto de la reacción química entre NO y el anión superóxido y es uno de los más poderosos oxidantes que son producidos en el cuerpo. Induce la nitración y

nitrosilación de los aminoácidos cisteína, metionina, triptófano y tirosina. Los peroxinitritos están presentes en los sitios donde las MDSCs y las células inflamatorias se acumulan, incluyendo sitios de reacciones inmunes en curso y están asociados con la progresión de tumores.

1.4.6 Mecanismos supresores en subgrupos de MDSCs.

Hallazgos recientes indican que los subgrupos de MDSCs pueden usar diferentes mecanismos para suprimir la proliferación de células T. Se han identificado en el ratón, dos tipos principales de MDSCs, un subgrupo monocítico con fenotipo CD11b⁺LY6G⁻LY6C^{hi} y uno granulocítico con fenotipo CD11b⁺LY6G⁺LY6C^{low}. El granulocítico expresa altos niveles de ROS y niveles bajos de NO, mientras que el subgrupo monocítico, expresa bajos niveles de ROS y altos niveles de NO; ambos expresan arginasa 1 (108). Curiosamente ambos tipos de MDSCs suprimen la proliferación de células T, antígeno específicas en igual medida a pesar de tener diferentes mecanismos de acción. Otro estudio consistente con estas observaciones, reporta a dos distintas poblaciones de MDSCs en ratones con tumores, uno que consiste en células mononucleares y un segundo grupo que consiste en células polimorfonucleares que son similares a los granulocitos inmaduros. Ambos subgrupos suprimen también la respuesta de las células T, aunque usan distintos vías y moléculas de señalización. La actividad supresora de las células granulocíticas depende de arginasa-1, mientras que el subgrupo monocítico depende de STAT1 e iNOS. Finalmente, en un estudio experimental de infección con *T. cruzi*, se observó la misma tendencia: las MDSCs monocíticas producen NO, inhibiendo fuertemente la proliferación de las células T, mientras que las MDSCs granulocíticas producen niveles bajos de NO (119). Sin embargo, esta subpoblación

no inhibió la proliferación de las células T, aunque produjeran altos niveles de anión superóxido (15). La significancia biológica de la dicotomía entre estos dos subpoblaciones de MDSC permanece sin ser elucidada (108) (Figura 12).

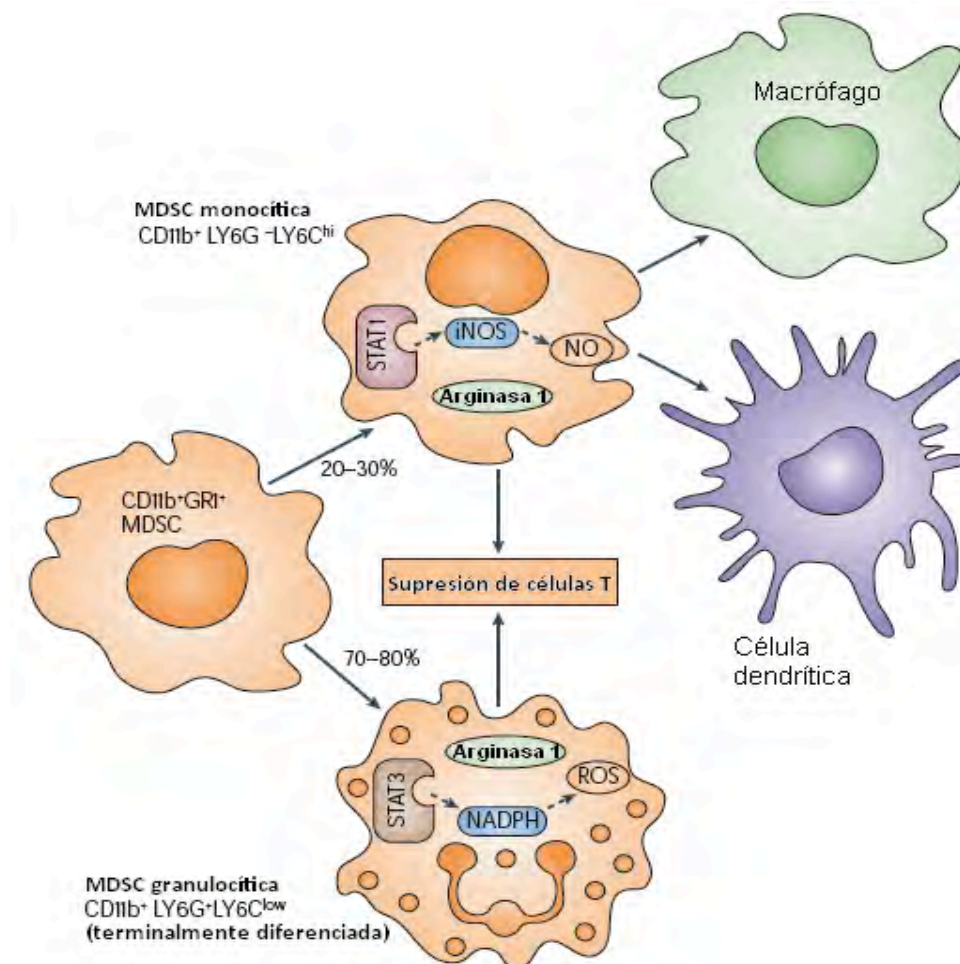


Figura 12. Mecanismos supresores mediados por los diferentes subgrupos de MDSCs. Las MDSCs en el ratón se diferencian en dos principales subgrupos: Las MDSCs monocíticas, las cuales tienen un fenotipo CD11b⁺LY6G⁻LY6C^{hi}; y las MDSCs granulocíticas con fenotipo CD11b⁺LY6G⁺LY6C^{low}. En la mayoría de los modelos tumorales predomina el linaje granulocítico (70-80%). Se ha sugerido que el subgrupo granulocítico tiene una actividad incrementada de STAT3 y NADPH, lo que resulta en niveles elevados de ROS y niveles bajos de óxido nítrico. ROS y peroxinitros [el producto química de la reacción entre el óxido nítrico (NO) y anión superóxido (O₂⁻)], inducen la modificación post-traducciona del receptor de las células T, ocasionando una falta de respuesta en este tipo celular. El linaje monocítico, tiene una expresión sobre-regulada de STAT1 y de la enzima óxido nítrico inducida (iNOS o NOS2) y niveles incrementados de NO pero producción baja de ROS. El óxido nítrico que es producido por el metabolismo de la L-arginina por iNOS, suprime la función de las células T a través de varios mecanismos, que involucran la inhibición de cinasas Janus-3 (JAK-3, por sus siglas en inglés) y STAT-5, la inhibición en la expresión del MHC clase II y la inducción de apoptosis. Ambos subgrupos tienen niveles incrementados de arginasa 1, la cual causa la supresión de las células T a través de la depleción de la L-arginina. Solo el linaje monocítico, puede diferenciarse in vitro en células dendríticas maduras y macrófagos. (Imagen modificada desde: Gabrielovich, Nat Rev Immunol, 2009).

1.4.7 Efectos de MDSCs en tejidos específicos.

Una pregunta fundamental que aún no tiene respuesta es, si las MDSCs median la supresión de las células T de manera antígeno específica. Los factores que median

la función supresora de las MDSCs (ROS, arginasa 1 y NO), inhiben la proliferación de cualquier tipo de célula T que se encuentre cercana. Estudios *in vitro* demuestran la supresión antígeno no específica de células T, mediada por las MDSCs (132, 133). Sin embargo la inmunosupresión mediada en órganos linfoides secundarios es principalmente antígeno específica. Esta hipótesis sustenta que la unión antígeno específica entre APCs y células T establece un contacto célula-célula más estable y más prolongado que es necesario para que los peroxinitritos y las ROS generadas por las MDSCs medien sus efectos en las moléculas expresadas en la superficie de las células T y que hacen que estas células queden sin respuesta a antígenos específicos. Se debe tener en cuenta que tales modificaciones en las moléculas de superficie, no lleva a la muerte a las células T, ni previene la activación de células T específicas. Otra evidencia que soporta la hipótesis de que las MDSCs median la supresión de células T de manera antígeno específica es el hallazgo que demuestra que las MDSCs pueden tomar antígenos solubles, incluyendo antígenos asociados a tumores, procesarlos y presentarlos a las células T (133, 134); el bloqueo de la interacción MDSC-célula T, con anticuerpos específicos contra el MHC clase I, elimina la inhibición de la respuesta de células T CD8⁺ ejercida por las MDSCs *in vitro*. La naturaleza de la supresión de células T CD8⁺ mediada por las MDSCs, restringida al MHC clase I, se ha demostrado también *in vivo* en modelos tumorales y modelos de enfermedad intestinal (135, 136). Esto es consistente con las observaciones recientes en un modelo de cáncer en que un número importante de MDSCs inducidas por tumores, no inhiben la respuesta de células T CD8⁺ específicas para antígenos sin relación con los antígenos tumorales (108). Actualmente no es claro si los mecanismos de supresión antígeno-específicos de las MDSCs son similares a los que operan en las células T CD4⁺, ya que sólo se han

evaluado los efectos de las MDSCs en células TCD8⁺. Es complicado abordar este cuestionamiento ya que solo una proporción pequeña de MDSCs expresan moléculas clase II, en muchos modelos tumorales (108).

La teoría que sostiene que las MDSCs suprimen la respuesta de las células T de una manera antígeno-específica, ayuda a explicar el hallazgo de que las células T de órganos linfoides periféricos de ratones con tumores y en sangre periférica de pacientes con cáncer, pueden responder a estímulos diferentes a los antígenos asociados a tumores, incluyendo virus, lectinas, moléculas co-estimuladoras, IL-2 y anticuerpos específicos para el CD3 y CD28 (137).

Hay evidencias que sugieren que la naturaleza de la supresión ejercida por las MDSCs en el sitio del tumor es diferente que la que ocurre en la periferia. Las MDSCs migran activamente al sitio del tumor (115), donde ellas sobre-regulan la expresión de arginasa-1 e iNOS y regulan a la baja, la producción de ROS y se diferencian rápidamente en macrófagos asociados a tumores (TAMs, por sus siglas en inglés). Los niveles de NO y arginasa-1 que son producidos por los TAMs son mucho más altos que aquellos producidos por las MDSCs, que están presentes en órganos linfoides periféricos. Además los TAMs producen varias citocinas que suprimen la respuesta de las células T, de manera antígeno-no específica (Figura 13). Los mecanismos por los cuales las MDSCs funcionan están regulados dentro del microambiente tumoral, y no es claro como difieren de aquellos que operan en la periferia. Es posible que células del estroma tumoral, hipoxia o el ambiente acidófilo tengan un papel en la regulación en la función de las MDSCs (108).

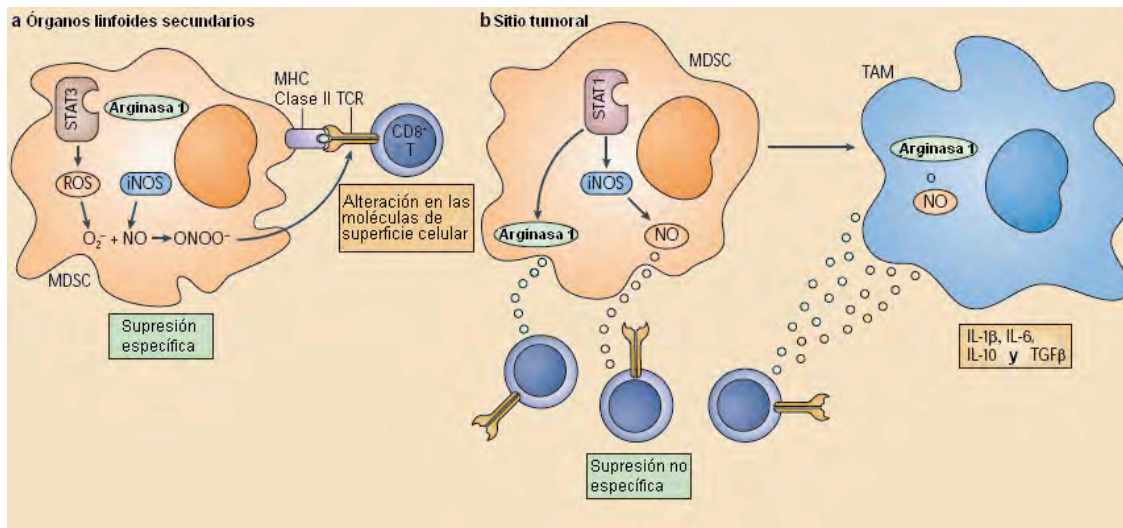


Figura 13. Mecanismos de supresión inmune mediada por las MDSCs en órganos linfoides secundarios y en sitios tumorales. Ver texto principal. (Imagen modificada desde: Gabrilovich, Nat Rev Immunol, 2009).

1.4.8 MDSCs como células mieloides regulatorias.

Las MDSCs posiblemente evolucionaron como un componente regulatorio del sistema inmune. En condiciones de estrés agudo, infección o inmunización, hay una expansión transitoria de esta población de IMCs, que rápidamente se diferencia en células mieloides maduras. Esta población de IMCs transitorias, puede mediar las funciones supresoras que son característica de las MDSCs pero, debido a las condiciones agudas son de vida corta, las funciones de supresión de esta población tiene un impacto mínimo en la respuesta inmune en general. Sin embargo, éstas células probablemente funcionan como vigías importantes, que impiden el daño patológico, mediado por la respuesta sin control del sistema inmune (108).

El papel de las MDSCs en las infecciones crónicas y el cáncer es diferente. En estas condiciones patológicas, la prolongada y marcada expansión de la IMC y su activación subsiguiente conduce a la expansión de una gran población de MDSCs con habilidades inmunosupresoras. Las MDSCs se acumulan en los órganos linfoides periféricos y migran hacia los sitios del tumor, donde contribuyen a la inmunosupresión. Por otra parte, algunas evidencias sugieren que las MDSCs también pueden inducir la expansión de células T reguladoras. Los estudios futuros

revelarán si las MDSCs pueden ser consideradas parte de una red de regulación natural inmune (108).

1.4.9 Metabolismo de la L-Arginina.

Para generar una respuesta inmune eficiente, las células T requieren la asistencia de células accesorias de origen mieloide que hacen accesible el antígeno al receptor de células T. Las células accesorias son también importantes para el aclaramiento de antígenos, destrucción de patógenos intracelulares, producción de colágeno y remodelación de tejidos. Las células mieloides funcionan como guías para los linfocitos, debido a que ellas deciden si una respuesta inmune debe ser iniciada y si las células T deben ser activadas, y aseguran que las células T activadas sean correctamente desactivadas para evitar daño a tejidos propios y la acumulación de grandes números de células antígeno específicas que no son requeridas después del aclaramiento del antígeno. Por ejemplo, las células de Langerhans en la piel, están estratégicamente ubicadas en el sitio de entrada del antígeno y expresan una gama de moléculas que ayudan en la preparación de células T vírgenes. Por el contrario, las células del sistema mielo-monocítico son movilizadas desde la sangre y órganos hematopoyéticos en números que son proporcionales al reto antigénico. Estas asisten en el aclaramiento de antígenos (los cuales se identifican a través de receptores tipo Toll) y cuando es necesario maduran en células dendríticas para llevar a cabo la respuesta inmune (138).

Las células mielo-monocíticas están equipadas con mecanismos extremadamente eficientes para destruir patógenos, y algunos subgrupos de estas células conocidas como MDSCs son altamente eficientes suprimiendo células T activadas. Una vía utilizada por estas células para regular a las células T, es manipulando el

metabolismo de la L-arginina, a través de las enzimas óxido nítrico sintasa-2 (NOS2 o iNOS) y arginasa, las cuales son reguladas por citocinas Th1 y Th2, respectivamente. Hallazgos recientes indican que MDSCs surgen en respuesta a varios retos antigénicos y su presencia podría explicar numerosas situaciones que están asociadas con la reactividad inmune alterada (138).

La L-arginina es un aminoácido esencial para mamíferos adultos en situaciones en las cuales los requerimientos exceden su producción como en el embarazo. Hallazgos recientes indican que el metabolismo incrementado de la L-arginina por células mieloides puede resultar en el daño de la respuesta de los linfocitos a antígenos durante la respuesta inmune y crecimiento tumoral. Dos enzimas que compiten por la L-arginina como un sustrato, son componentes cruciales de la supresión de la respuesta de linfocitos: arginasa y óxido nítrico sintasa, así como también sus productos metabólicos, son importantes moderadores de la función de células T (138).

La L-arginina es un aminoácido utilizado en la biosíntesis de proteínas como creatina (nutriente para los músculos), agmatina (posible neurotransmisor), y es metabolizado principalmente por las enzimas arginasa y óxido nítrico sintasa para producir urea y L-ornitina, óxido nítrico y L-citrulina, respectivamente (138).

1.4.10 Arginasa.

En organismos unicelulares, el agotamiento de nutrientes es una estrategia que es usada para regular la proliferación de células que compiten por el mismo nicho biológico. La familia de enzimas arginasas, esta altamente conservada entre las especies. En patógenos estas enzimas tienen la capacidad de metabolizar la L-arginina del huésped, agotando así los niveles de este aminoácido como estrategia

de supervivencia y usando su propia arginasa o la del huésped. Por ejemplo, el gen RocF de *Helicobacter pylori* codifica a una arginasa que se expresa constitutivamente, la cual consume la L-arginina y previene la producción de óxido nítrico (con propiedades bactericidas) por iNOS en macrófagos en cultivo (139).

En organismos superiores el control del metabolismo del aminoácido, se conservó evolutivamente para limitar la expansión indeseada de células proliferantes activas, incluyendo células T (140). La arginasa hidroliza a la L-arginina a L-ornitina y urea. La L-ornitina es un precursor para la síntesis de poliaminas a través de la ornitina descarboxilasa (ODC, por sus siglas en inglés) y para la síntesis de la L-prolina por la enzima ornitina aminotransferasa (OAT, por sus siglas en inglés); las poliaminas están involucradas en la diferenciación y crecimiento celular, mientras que la L-prolina afecta la producción del colágeno (138).

Se han identificado dos isoformas de la L-arginasa: arginasa-1 y arginasa-2, que son codificadas por diferentes genes. Las isoformas son idénticas en un 58% a nivel de la secuencia de aminoácidos, pero tienen distintas distribuciones celulares. La arginasa-1 (también conocida como arginasa tipo hepática) es localizada en el citosol de hepatocitos y es un componente importante del ciclo de la urea. Además su expresión es inducida en células mieloides de ratón a través de la exposición de citocinas Th2, como IL-4 ó IL-13, así como también por el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) (138).

En ratón, se ha reportado que la región que codifica para la arginasa-1 contiene en su extremo 5' elementos reguladores de la transcripción en respuesta a IL-4, AMPc, TGF- β y dexametasona. El factor de transcripción más importante para arginasa-1 es el activador de la transcripción y transductor de señal-6 (STAT 6, por sus siglas en inglés), pero también hay rutas independientes de STAT 6. El activador de la

transcripción y transductor de señal-1 (STAT-1, por sus siglas en inglés) podría ser requerido para la inducción en la expresión de arginasa-1 e iNOS, pero las rutas moleculares no han sido totalmente elucidadas. La arginasa-1 humana, es expresada constitutivamente por granulocitos, pero su expresión no es sobre-regulada por los estímulos que afectan al análogo de la arginasa-1 en el ratón. La arginasa-2 (también conocida como, arginasa tipo renal) está localizada en la mitocondria de varios tipos celulares, incluyendo células renales, neuronas, macrófagos y enterocitos. Se expresa constitutivamente, y se piensa que incrementa en la síntesis de la L-prolina, debido a su cercana proximidad a la ornitina aminotransferasa, la cual es localizada también en la mitocondria (138). La inducción de la expresión de la arginasa-1 en varios sistemas biológicos es vinculada estrictamente con la sobrerregulación de los transportadores de membrana de la L-arginina, indicando que estas forman una unidad funcional (Figura 14). Los transportadores de aminoácidos catiónicos de ratón CAT2A, CAT2B, CAT3 y CAT4 (CATs, por sus siglas en inglés) son proteínas integrales de membrana que transfieren L-lisina, L-arginina y L-ornitina a través de una vía que es independientes del pH, sensible a estimulación y saturable. Las CATs bombean L-arginina desde el compartimiento extracelular al intracelular para compensar su degradación por la arginasa-1 intracelular (o por NOS) (138).

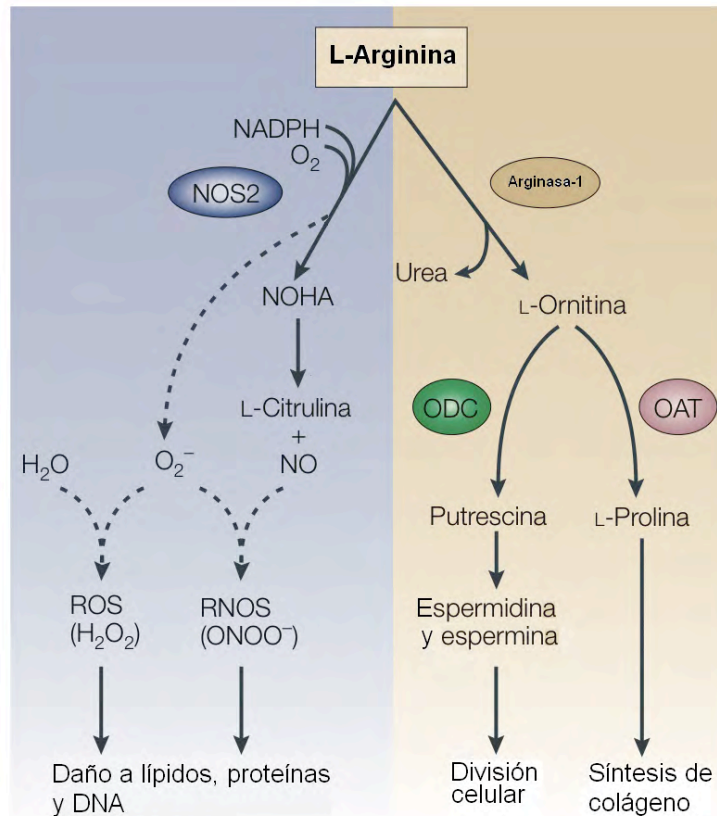


Figura 14. Representación esquemática de rutas metabólicas dependientes de las enzimas arginasa-1 e iNOS (NOS2). Las actividades de ambas enzimas se ilustran junto con las rutas metabólicas corriente abajo, que son activadas por la L-Arginina. Las líneas continuas indican la actividad enzimática principal, mientras que la línea punteada indica la ruta metabólica alternativa. En particular, cuando las concentraciones de la L-arginina son limitadas, los electrones se transfieren a través de subunidades de iNOS al co-sustrato O_2 , el cual genera al ión superóxido (O_2^-). El O_2^- (de esta reacción o de otra fuente) puede reaccionar con óxido nítrico para generar peroxinitritos ($ONOO^-$) o con agua para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se ha reportado la producción de peroxinitritos por la actividad combinada de arginasa-1 e iNOS, la producción de H_2O es indicada, considerando el mecanismo de reacción química y por las observaciones iniciales, aunque aún no ha sido comprobado completamente. Debe notarse que otras reacciones oxidativas generan a las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés reactive oxygen species) en la célula. NOHA, N^G -hydroxy-L-arginine; RNOS, reactive nitrogen-oxide species.) (Imagen modificada desde: Bronte, Nat Rev Immunol, 2005).

La unidad funcional arginasa CAT que esta activada en células supresoras de origen mieloide es una de las consumidoras principales de L-arginina del microambiente celular. Los macrófagos de ratón que son estimulados *in vitro* con citocinas Th2 (IL-4 ó IL13) entran en una sobrerregulación coordinada en la expresión de arginasa-1 y CAT2B, lo cual resulta en una disminución de la L-arginina extracelular, por debajo del nivel normal en suero de 50-150 mM. El consumo y agotamiento de la L-arginina tiene un efecto importante en la función de la células T (138).

1.4.11 Óxido nítrico sintasa.

La L-arginina es también el sustrato para una familia de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS, por sus siglas en inglés). Las enzimas NOS son dímeros que para su actividad requieren la presencia de calmodulina y los cofactores (6R)-5, 6, 7, 8-tetrahidrobiopterin (BH₄), al grupo Hem (iron-protoporfirin IX, hierro protoporfirina IX), flavina adenina dinucleótido (FAD, por sus siglas en inglés), Flavina mononucleótido (FMN, por sus siglas en inglés). Se han descrito tres isoformas de la enzima NOS, como productos de diferentes genes. Estas isoformas son idénticas en un 50% pero difieren en su localización intracelular, regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad inhibitoria: NOS1 (también llamada nNOS) predomina en tejido neuronal; NOS2 (también llamada iNOS) es la isoforma inducida, la cual está presente en varias células del sistema inmune, incluyendo varios tipos de células mieloides; y NOS3 (también llamada eNOS) se encuentra en células endoteliales. Dos dominios principales pueden ser identificados en cada isoforma de NOS: un dominio oxigenasa amino terminal y un dominio reductasa carboxi-terminal. Los electrones donados por conversión de NADPH a NADP son transferidos al dominio oxigenasa a través de una cadena redox que involucra a los transportadores electrónicos FAD y FMN. El dominio oxigenasa por lo tanto usa a los cofactores hem y BH₄ para catalizar la reacción entre (O₂) y L-arginina, lo cual genera L-citrulina y NO. La presencia de calmodulina unida, es necesaria para el flujo de electrones (138).

La expresión de iNOS y la producción de NO se ha descrito claramente en macrófagos, neutrófilos eosinófilos, DCs y células NK de ratón. El inductor de iNOS más usado comúnmente es la citocina Th1 IFN- γ , particularmente en combinación

con el lipopolisacárido, componente principal de la membrana externa de las bacterias gram-negativas (LPS, por sus siglas en inglés) pero también puede ser activada por otras citocinas inflamatorias como IL-1, TNF, IFN- α o IFN- β . Estas citocinas regulan varios factores de transcripción tales como el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) la proteína activadora 1 (AP1, por sus siglas en inglés), factor regulatorio-1 de INF- γ y STAT1. Estudios en ratón han indicado que células inmaduras del linaje de macrófagos/monocitos, liberan NO después de la activación con IFN- γ y agonistas específicos de CD40 (138).

1.4.12 Regulación de las células mieloides.

En células mieloides de ratón (macrófagos, DCs y granulocitos), la arginasa 1 y NOS están reguladas competitivamente por citocinas Th1 y Th2 (Figura 17). El metabolismo de la L-arginina en macrófagos se ha usado como un parámetro importante, para discriminar entre macrófagos activados por una vía clásica o activados por una vía alterna. La citocina Th1, IFN- γ , que induce la activación clásica de macrófagos, incrementa la secreción de NO a través de la actividad de iNOS e inhibe la actividad de la arginasa-1 que es regulada por las citocinas IL-4 ó IL-10. La activación alterna está regulada por citocinas Th2, tales como IL-4, IL-10 e IL-13, de las cuales, todas inhiben la actividad de la enzima iNOS, e inducen la síntesis de arginasa-1 (Figura 15). Este control de actividad enzimática, dependiente de citocinas, se ha tomado como prueba de las distintas etapas transitorias de macrófagos. Los macrófagos activados por la vía clásica liberan citocinas pro-inflamatorias y son los elementos centrales de la hipersensibilidad de tipo tardía, lo cual lleva a la actividad microbicida (a través de la liberación de NO por iNOS) y a la inmunidad celular. Por contrario los macrófagos activados por la vía alterna, son

esenciales para la inmunidad humoral, reparación de tejidos y fibrosis (de los cuales todos son mediados a través de la producción de poliaminas y L-prolina por arginasa), así como respuestas alérgicas y antiparasitarias (138).

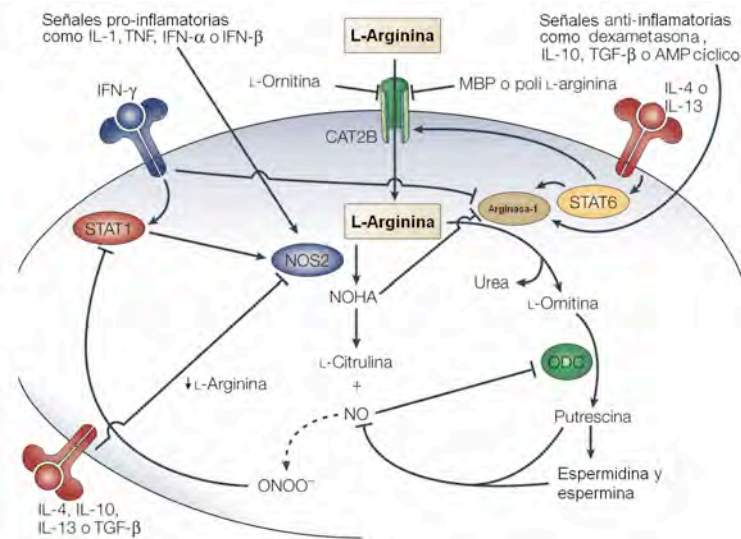


Figura 15. Circuitos metabólicos regulatorios y dependientes de citocinas que afectan las enzimas inducidas arginasa-1 e iNOS (NOS2). La citocina Th1 IFN-γ y las citocinas Th2 IL-4 e IL-13 son los inductores principales de iNOS y arginasa-1 respectivamente. Señales pro-inflamatorias (como IL-1, TNF, INF-α e IFN-β) y señales anti-inflamatorias (como IL-10, TGF-β, AMP cíclico y dexametasona) pueden contribuir a la regulación del balance final de la actividad de iNOS y arginasa-1. Además, la arginasa-1 e iNOS activan directamente varios circuitos bioquímicos que regulan negativamente una a la otra. La baja concentración extracelular de L-arginina, la sobre-expresión de arginasa-1 o la reducción en la capacidad de toma de la L-arginina, pueden disminuir los niveles intracelulares de L-arginina (↓ L-arginina) y detener la traducción del RNA mensajero que codifica la iNOS, reduciendo la actividad de iNOS. Los productos y moléculas del metabolismo de la L-arginina funcionan en el citosol, pero también pueden ser liberados extracelularmente. Óxido Nítrico (NO, nitric oxide), N⁶-hidroxi-L-Arginina (NOHA, N⁶-hydroxy-L-Arginine), L-ornitina, poliaminas (incluidas putrescina, espermidina y espermita), N⁶-monometil-L-arginina monoacetato e incluso la arginasa-1 por sí misma, pueden ser encontrados en el espacio extracelular. NOHA puede ser liberado por macrófagos durante la actividad intensa de iNOS; por tanto puede inhibir la actividad de la arginasa-1, estimulando una mayor liberación de NO por iNOS en células vecinas durante las reacciones inflamatorias. El óxido nítrico causa la S-nitrosilación de los residuos de cisteína presentes en el sitio activo de la ornitina descarboxilasa (ODC, ornithine decarboxylase), lo cual resulta en su inhibición enzimática y subsecuentemente en el arresto de la producción de poliaminas y proliferación celular. A la inversa, las poliaminas producidas por ODC son inhibidores de iNOS. En adición, la L-ornitina y proteínas catiónicas de origen eosinofílico (EDCP, eosinophil-derived cationic protein) (como proteínas básicas principales (MBP, por sus siglas en inglés) y su análogo poli-L-arginina) pueden impedir el transporte de L-arginina dependiente de CAT2B (CAT2B, cationic amino-acid transporter 2B). ONOO⁻, peroxinitrito; STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription. (Imagen modificada desde: Bronte, Nat Rev Immunol, 2005).

La separación de los macrófagos activados clásicamente y de los que son activados alternativamente, a través del balance NOS-arginasa, podría ser un enfoque simplificado. El LPS, el cual es un inductor de citocinas Th1, puede activar la expresión de ambas enzimas, arginasa-1 e iNOS por los macrófagos de otros roedores diferentes del ratón (140). Bronte y col. encontraron recientemente que las MDSCs pueden usar tanto arginasa-1 como iNOS para afectar la función de células T, en ratones con tumores (141).

1.4.13 Supresión de células T.

La arginasa-1 e iNOS, son enzimas que pueden ser utilizadas tanto individualmente como en conjunto por las MDSCs para suprimir la respuesta de las células T. La elección de cuál de estas enzimas se utilizará, está regulada por una compleja red de señalización la cual es la base para que las MDSCs y células T activadas puedan interactuar. El mecanismo molecular que regula la activación y proliferación de las células T, depende de la actividad enzimática predominante (138).

1.4.14 Supresión dependiente de arginasa.

En un modelo experimental de cáncer pulmonar en ratón, se encontró un infiltrado de células mieloides, CD11b⁺GR1⁻F4/80⁻CD16 (FcγRIII)⁺CD32 (FcγRII)⁺ que expresaban altos niveles de arginasa-1 y CAT2B. Cuando estas células mieloides son aisladas de tumores, incorporan y consumen rápidamente a la L-arginina del medio extracelular e inhiben la re-expresión de la cadena ζ del CD3, después de la internalización inducida del TCR en células T antígeno específicas, dañando así la función de estas células (142). Este mecanismo parece ser relevante para la proliferación tumoral y para evadir su eliminación *in vivo*, ya que la inyección del inhibidor de arginasa (*N*-hydroxy-nor-L-arginine), disminuyó el crecimiento tumoral de manera dependiente a la dosis (142).

La molécula ζ del CD3 es el componente principal para la transducción de señales en el TCR y es requerido para el ensamble correcto del complejo receptor. La pérdida de la cadena del ζ CD3 es el único mecanismo descrito hasta la fecha, que demuestra tener relevancia en la función de las células T. Sin embargo, la actividad de la arginasa-1 en MDSCs lleva al agotamiento de la L-arginina y a la producción de urea en el ambiente local, se ha demostrado que la pérdida del aminoácido y la

presencia de la urea, altera la traducción de varios RNA mensajeros en otros tipos celulares, a través de vías de cinasas que involucran a la cinasa de control general no reprimible (GCN2, por sus siglas en inglés) y a la cinasa que es blanco de la rapamicina (MTOR, por sus siglas en inglés) (Figura 16a). Como consecuencia del agotamiento del aminoácido, incrementa el nivel de tRNAs que están sin llevar anclado al aminoácido correspondiente y esto activa a la cinasa GCN2. La cinasa GCN2 se une al tRNA y por lo tanto se detecta el agotamiento del aminoácido, fosforilando un residuo serina en la posición 51 de la subunidad- α del factor 2 de iniciación de la traducción eucariótica (EIF2- α , por sus siglas en inglés). La fosforilación de EIF2- α suprime la síntesis de proteínas deteniendo la iniciación de la traducción. Aún queda sin determinarse, si este mecanismo aplica a las células T, a través de la depleción de la L-arginina por las MDSCs. Las concentraciones bajas de L-arginina extracelular, la sobre-expresión de arginasa y la captación reducida la L-arginina, disminuye la concentración intracelular de la L-arginina y detiene la traducción de RNA mensajero que codifica a iNOS, siendo esto un posible mecanismo antiinflamatorio generalizado. Las concentraciones bajas del aminoácido o, la producción incrementada de urea involucran también a la vía de MTOR. La rapamicina es un inmunosupresor natural que inhibe la proliferación de células T en respuesta a nutrientes y factores de crecimiento. Fuentes de nitrógeno (tales como la urea), la limitación de aminoácidos y la rapamicina suprimen a la cinasa MTOR, la cual es clave para la iniciación de la traducción en células de mamífero a través de la proteína cinasa S6 (142).

Mientras estas evidencias corroboran los efectos del agotamiento de la L-arginina en la función de las células T. No se ha mostrado un papel convincente para las moléculas generadas por la arginasa. Sin embargo, las poliaminas que son

generadas por la vía metabólica de la arginasa-ODC, pueden tener un papel antiinflamatorio regulando a la baja la liberación de citocinas pro-inflamatorias en los monocitos (143).

1.4.15 Supresión dependiente de NOS.

Experimentos en los que se ha revertido la inmuno-supresión in vivo e in vitro, han demostrado el papel inmunoregulatorio del NO, esto se ha logrado a través del uso de inhibidores de la enzima NOS y demostrando que las MDSCs provenientes ratones deficientes para la enzima iNOS carecen de función inmunosupresora. La supresión en la activación de las células T mediada por NO, no está asociada a los eventos tempranos del proceso de reconocimiento antigénico del TCR, sino con la cascada de señalización río abajo que ocurre después de la unión de la IL-2 con su receptor. Se sabe que el NO regula negativamente a proteínas de señalización intracelulares, ya sea directamente a través de a nitrosilación de residuos de cisteína, o indirectamente por la activación de la enzima guanilato ciclasa (GC, por sus siglas en inglés) y a la proteína cinasa dependiente del guanosín monofosfato cíclico (cGMP, por sus siglas en inglés). En las células T, el NO puede bloquear la fosforilación y por lo tanto la activación de proteínas de señalización importantes, de la vía del receptor de IL-12 (incluidas proteínas cinasas Janus activadas (JAK-1, JAK3), STAT5, cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK, por sus siglas en inglés) y cinasas AKT. Estudios en células T de humanos han demostrado que el NO afecta la estabilidad del mRNA que codifica para la IL-2 en linfocitos activados (Figura 16b). La liberación persistente de NO por las MDSCs podría también estar asociada al bloqueo transcripcional de STAT5A y STAT5B en células T y B que es observado en ratones con carcinomas e individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (144, 145), y por lo tanto podría ser relevante en

la disfunción de las células T que se observa bajo estas condiciones. Se ha demostrado un efecto pro-apoptótico en células T que son expuestas a concentraciones altas de NO, y este efecto se podría iniciar por varios mecanismos, tales como la acumulación de la proteína supresora tumoral p53 que señala a través de la molécula CD95 (llamada también FAS) o a través de miembros de la familia de receptores del TNF o señalizando a través de vías independientes de caspasa (138).

1.4.16 Supresión dependiente de la cooperación de arginasa y NOS.

Es difícil concebir una sinergia entre estas dos enzimas en las MDSCs, ya que algunos trabajos demuestran que la activación de la arginasa, limita la disponibilidad de la L-arginina como un sustrato para NOS y por lo tanto regula negativamente su actividad enzimática (146). Sin embargo cuando se induce la expresión de ambas enzimas, las consideraciones cinéticas indican que la producción del óxido nítrico no debe ser afectada en gran medida: aunque la arginasa tiene menor afinidad por el sustrato, la arginasa cataliza la reacción 1000 veces más rápido que iNOS, lo que indica la L-arginina es metabolizada a la misma velocidad por estas dos enzimas (147). Pero la depleción de la L-arginina citosólica en las MDSCs por la arginasa tiene un efecto adicional importante –la generación del anión superóxido (O_2^-) (138). Cuando las concentraciones de L-arginina son bajas, los dominios oxigenasa y reductasa de la enzima iNOS transfieren los electrones a el co-sustrato O_2 y produce el O_2^- , el cual reacciona con otras moléculas como con el óxido nítrico, generando por lo tanto, varias especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RNOS, por sus siglas en inglés), como el peroxinitrito ($ONOO^-$) y ROS, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas especies, pueden tener múltiples actividades inhibitorias en las células T. Recientemente se mostró una actividad combinada de arginasa y NOS, en un

células mieloides CD11b⁺ provenientes de infiltrados tumorales (138). Esto indica que la co-expresión de NOS y arginasa podría ser un marcador de MDSCs, pero debe tenerse en cuenta que la producción de altos niveles de ROS se pone en duda en estudios que demuestran que la depleción de L-arginina extracelular en células mieloides impide la traducción del RNA mensajero que codifica la enzima iNOS y es esta enzima quien permite la producción de ROS (148). Tanto las ROS (H₂O₂) como las RNOS (ONOO⁻) son capaces de cruzar las membranas dentro de las células o entre ellas (por ejemplo entre las MDSCs y las células T, Figura 16c) Los peroxinitritos pueden por lo tanto funcionar como mensajeros intra- e inter-celulares inusuales, ya que pueden inducir modificaciones post-traduccionales en las proteínas, a través de la nitración de los residuos de tirosina (Figura 16c). La nitración de los residuos de tirosina puede por lo tanto influenciar en diferentes actividades biológicas, como la actividad o inactividad enzimática, diferenciación y proliferación celular. Los peroxinitritos pueden también llevar a las células T hacia apoptosis a través de vías de señalización (Figura 16c). En dosis altas, los peroxinitritos controlan la muerte celular, por nitración de componentes de la membrana mitocondrial, lo cual causa daño en este organelo celular y por lo tanto la liberación de factores que promueven la muerte celular, como el citocromo c (138).

Los peroxinitritos no son los únicos que tienen actividad inmunomoduladora. El H₂O₂ originado a partir de la reacción entre el O₂⁻ y los protones (H⁺) del agua (H₂O) de acuerdo a la siguiente fórmula: $2O_2^- + 2H^+ \rightleftharpoons H_2O_2$. Las MDSCs, aisladas de bazo de ratones con tumores fueron capaces de inhibir la secreción de IFN γ , a través de la producción de ROS y el principal inhibidor fue el H₂O₂ (115). El H₂O₂ generado por las MDSCs CD11b⁺GR1⁺, logró afectar la expresión de la cadena ζ del CD3 en un modelo experimental en ratón (149). En pacientes con cáncer

avanzado, el H_2O_2 producido por granulocitos de baja densidad circulantes, fue reconocido como el causante del daño funcional de las células T a través de la afección en la expresión de la cadena ζ del CD3 (Figura 16c) (118). Al igual que los peroxinitritos, el H_2O_2 puede ser responsable de inducir apoptosis celular, regulando a la baja a la proteína anti-apoptótica-2 (BCL-2) e incrementando los niveles de él ligando CD95 (conocido también como FAS ligando) (Figura 16c).

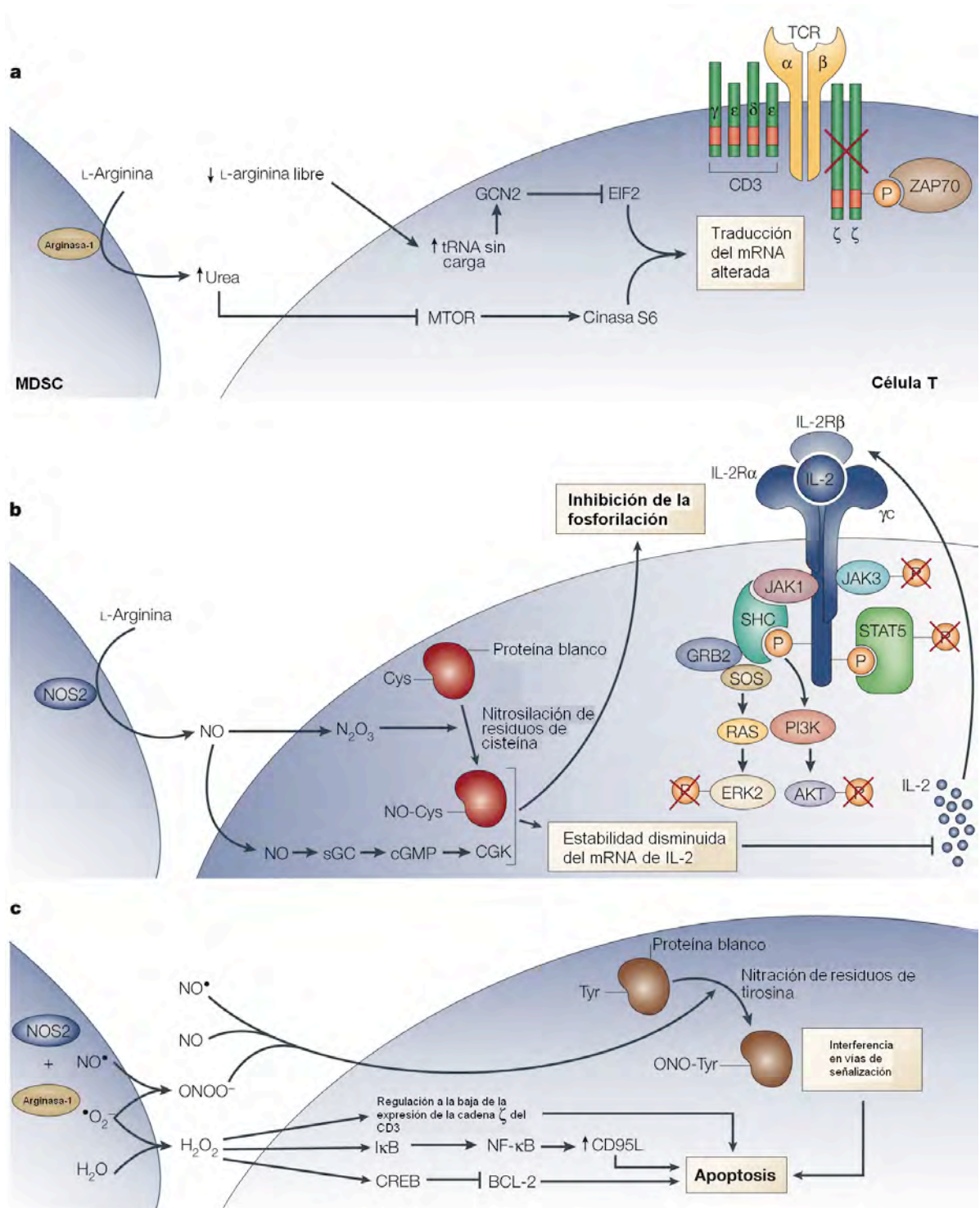


Figura 16. Las enzimas arginasa-1 e iNOS (NOS2) o ambas, pueden ser activadas en células mieloides y frenar la activación de células T a través de diferentes rutas. a) La actividad de la arginasa-1 causa el bloqueo traduccional de la cadena del ζ CD3, posiblemente a través de diferentes vías de señalización que involucran a la cinasa que es blanco de la rapamicina (MTOR,) y la cinasa de control general no reprimible (GCN2). b) iNOS (NOS2) a través del óxido nítrico causa la nitrosilación de residuos de cisteína en proteínas blanco y genera la producción de GMP cíclico por la ruta de la enzima guanilato ciclasa (sGC). Estos eventos interfieren con la señalización del receptor de la IL-2, bloqueando la fosforilación de diversas moléculas transductoras de señales que se acoplan al receptor de la IL-2 y alterando al RNA mensajero que codifica para la citocina IL-2. c) Cuando ambas enzimas son activadas, se desencadena la producción de ROS (H₂O₂) y RNOS (ONOO⁻), las cuales inducen apoptosis celular (ver texto principal). γc, common cytokine receptor γ chain (Cadena γ de receptor común de citocina); CGK, cGMP-dependent protein kinase (proteína cinasa dependiente de GMP cíclico); CREB, cyclic-AMP-responsive-element-binding protein (Proteína de unión en respuesta a AMP cíclico); (Imagen modificada desde: Bronte, Nat Rev Immunol, 2005).

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La enfermedad de Chagas es endémica en varias regiones de México. Se estima que la incidencia anual por transmisión vectorial es de 7,700 casos nuevos con una prevalencia de 1, 100,000 personas infectadas. La población expuesta en zonas endémicas es de aproximadamente 29,500,000 (10).

Se considera que la frecuencia de la enfermedad de Chagas esta subestimada ya que en la mayor parte de los centros hematológicos no se realiza de manera rutinaria una prueba diagnóstica para dicha patología.

Actualmente no existe en México un estudio en el que se correlacionen los datos clínicos con los hallazgos inmunológicos provenientes de los pacientes con Enfermedad de Chagas. Un conocimiento de este tipo nos ayudaría a comprender más ampliamente la respuesta fisiopatológica de esta enfermedad, así como proponer en un futuro nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.

Por este motivo nuestro objetivo en este trabajo fue caracterizar las principales poblaciones celulares de origen linfoide ($CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$) y mieloide ($CD33^+$, $CD14^+$) y a una población de origen mieloide no estudiada en enfermos Chagásicos, con fenotipo $CD33^+/CD14^-/CD11b^+/HLA-DR^-/iNOS^+$, dicha población tiene como función suprimir la respuesta de células T. La información obtenida sobre esta población celular podrá abrir nuevas líneas de investigación que ayuden a entender los mecanismos inmunopatológicos de la enfermedad de Chagas.

III. HIPÓTESIS.

Las células con fenotipo CD33⁺/CD14⁻/CD11b⁺/HLA⁻DR⁻/iNOS⁺ se encuentran incrementadas en las distintas etapas de la enfermedad de Chagas respecto a sujetos control.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Conocer la frecuencia y estado funcional de la subpoblación celular de origen mieloide CD33⁺/CD14⁻/CD11b⁺/HLA⁻DR⁻/iNOS⁺ y de linfocitos T en células mononucleares de sangre periférica en la enfermedad de Chagas humana.

4.2 Objetivos Específicos

1. Conocer la frecuencia de dos poblaciones de origen mieloide: A) CD33⁺CD14⁻CD11b⁺ y B) CD33⁺CD14⁻CD11b⁺HLA⁻DR⁻iNOS⁺
2. Conocer la frecuencia de expresión de interferón γ (IFN γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) intracelular en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.
3. Cuantificar los niveles de arginasa⁻1 en plasma de sujetos estudiados de los distintos grupos.
4. Cuantificar la actividad enzimática de arginasa total en plasma de sujetos de los distintos grupos.

V. MÉTODOS

5.1 Población de estudio

Se estudiaron pacientes en las distintas etapas clínicas de la enfermedad de Chagas y sujetos control negativos (Tabla 2) para *T. cruzi*, como sigue:

Grupo 1. Sujetos sanos (11)

Grupo 2. Etapa crónica indeterminada (12)

Grupo 4. Etapa Crónica (CCC; cardiopatía chagásica crónica) (11)

Grupo 5. Miocardiopatías dilatadas idiopáticas (MDI) (11, sujetos en los análisis fenotípicos y actividad de arginasa; 12 sujetos en el análisis de los niveles de arginasa-1)

Tabla 2. Características Demográficas de los sujetos estudiados

n. total 37	Controles	Crónicos	CCC	MDI
n. chagásicos 23		indeterminados		
Número de sujetos	11	12	11	11
Genero (Masc/Fem)	(6/5)	(8/4)	(7/4)	(6/5)
Edad (años)	48 ±18	42 ±13	50 ±13	36 ± 8
Prueba positiva de ELISA para <i>T. cruzi</i> .	0/11	12/12	11/11	0/11

5.2 Criterios de inclusión.

Forma indeterminada:

Para el grupo de pacientes con la forma indeterminada de la enfermedad, se incluyeron aquellas personas que cumplían con los siguientes criterios:

a) estudio serológico positivo para Chagas;

- b) ausencia de síntomas y signos de enfermedad;
- c) electrocardiograma normal;
- d) radiografía de tórax normal.

Forma crónica:

El grupo de pacientes en etapa crónica sintomática fueron definidos con los siguientes criterios:

- a) pacientes procedentes de área endémica con miocardiopatía, visceromegalias (megacolon, megoesófago) o alteraciones neurológicas.
- b) Anticuerpos positivos contra el *Trypanosoma cruzi*, detectados por dos de tres de las siguientes técnicas: ELISA, Inmunofluorescencia indirecta y Hemaglutinación.

Sujetos sanos:

Los sujetos sanos cumplieron los siguientes criterios:

- a) diagnóstico serológico y parasitológico negativo para *T. cruzi*
- b) ausencia de cualquier patología cardíaca o visceromegalias
- c) que no procedan de áreas endémicas para la enfermedad de Chagas

Miocardiopatía Dilatada Idiopática:

Los sujetos con cardiopatías dilatadas idiopáticas cumplieron con los siguientes criterios

- a) Diagnóstico serológico y parasitológico negativo para *T. cruzi*
- b) Diagnóstico de cardiopatía arritmogénica de ventrículo derecho

5.3 Criterios de exclusión:

- a) Sujetos de sexo femenino embarazadas
- b) Sujetos que no quisieran participar en el estudio

5.4 Obtención de células mononucleares.

Se emplearon células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) de los sujetos clasificados dentro de los 5 grupos. La sangre venosa heparinizada de los pacientes y controles sanos se separó por un gradiente de centrifugación (Ficoll Hypaque, Amersham). Las células obtenidas se lavaron dos veces con Buffer Fosfato Salino (PBS, por sus siglas en inglés) y se determinó la viabilidad por método de exclusión con azul de tripano. Las células restantes, se resuspendieron en dimetil sulfoxido (DMSO, por sus siglas en inglés) al 10% y suero fetal bovino al 90% a una concentración de 10^6 células por mililitro, conservándolas en nitrógeno líquido hasta su uso.

5.5 Inmunofenotipificación de MDSCs y linfocitos T

La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera: 1) se lavaron las células descongeladas con buffer PBS-BSA 1% durante 10 minutos a $400 \times g$; 2) se resuspendieron en 50 μ l del mismo buffer; 3) se incubaron con cada uno de los anticuerpos (1 mg/ millón de células) en las combinaciones adecuadas durante 30 minutos; 4) se lavaron con el mismo buffer dos veces y 5) por último se resuspendieron en 0.5 ml PBS con paraformaldehído al 1%. Para los anticuerpos intracelulares empleados (iNOS, TNF- α e IFN- γ), las células se incubaron después del lavado de los anticuerpos de superficie con una solución citofix/cytoperm (BD biosciences) durante 20 minutos, después de lo cual se lavaron y se tiñeron con los anticuerpos intracelulares adecuados durante 20 minutos. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra marcadores de superficie de células humanas se detallan en la tabla 3. Las células se lavaron y se agregaron 0.5 ml de PBS. Las células se analizaron en el citómetro de flujo FACS Aria con el software FACSDiva 6.0.

Tabla 3. Anticuerpos monoclonales usados en citometría de flujo.

Antígeno	Marca	Compañía
CD3	PE ⁻ Cy5	BD BIOSCIENCES
CD4	APC ⁻ Cy7	BD BIOSCIENCES
CD8	PerCP	BD
CD8	PE ⁻ Cy7	BD BIOSCIENCES
CD11b	PE	BD BIOSCIENCES
CD11c	APC	BIOLEGEND
CD14	PE ⁻ Cy7	BIOLEGEND
CD33	APC	BIOLEGEND
HLA ⁻ DR	PE ⁻ Cy5	BDBIOSCIENCES
iNOS	FITC	BD BIOSCIENCES
IFN ⁻ γ	PE ⁻ Cy7	BIOLEGEND
TNF ⁻ α	APC	BIOLEGEND

HLA: Human Leukocyte antigen (antígeno de leucocitos humanos); FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina; APC: Alofocianina; PerCP: Peridin clorofil proteína.

5.6 Determinación de óxido nítrico en MDSCs

Para la determinación del óxido nítrico se utilizó el indicador fluorescente DAF-FM DA (Calbiochem®) (3-Amino, 4-aminomethyl-2',7'-difluorescein, Diacetate), dicho indicador fue detectado por citometría de flujo.

5.7 Cuantificación de Arginasa-1

Para la determinación de Arginasa-I se utilizó un kit comercial de ELISA (Hb, Hyclone Biotechnology).

5.8 Determinación de la actividad enzimática de Arginasa

Para la determinación de la actividad de arginasa total, se utilizó el KIT comercial para la determinación de arginasa (QuantiCromTM), el cual es un ensayo colorimétrico que utiliza un cromógeno que forma un complejo de color, específicamente con la urea. La intensidad del color es directamente proporcional a la actividad de arginasa en la muestra. Se combinaron 40 μ L de la muestra y 10 μ L

del Buffer de Sustrato 5x dentro de un pozo en una placa de 96 pozos. En pozos separados de la placa se transfirieron 40 μL de la muestra sin Buffer de Sustrato 5x (Control blanco de la muestra); 50 μL de agua y 50 μL del estándar de urea 1 mM (Control estándar positivo) e incubaron a 37°C por 2 horas. Se adicionaron 200 μL del reactivo de urea a todos los pozos y posteriormente se adicionó 10 μL del buffer de sustrato 5x al pozo control (blanco de la muestra). Finalmente se incubó 60 minutos a temperatura ambiente y leyó en un espectrofotómetro a una densidad óptica de 430 nm.

Actividad de Arginasa (unidades por litro de muestra) fue calculada a través de la siguiente fórmula:

$$= \frac{\text{D.O. MUESTRA} - \text{D. O. BLANCO}}{\text{D.O. ESTÁNDAR} - \text{D.O. AGUA}} \times [\text{Estándar de urea}] \times 50 \times 10^3 / (40 \times t)$$

[Estándar de Urea] = 1 mM, t es el tiempo de reacción (120 min). 50 y 40 son los volúmenes (μL) de solución reacción (muestra y sustrato) y de la muestra sola, respectivamente. O.D. = Densidad Óptica

Definición de Unidad de arginasa: 1 unidad de arginasa convierte 1 μmol de L-arginina en ornitina y urea por minuto a pH 9.5 y 37°C.

VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentaron como mediana y rangos (valor mínimo y máximo) debido a que los datos no se aproximaban a una distribución Gaussiana. Se realizó un análisis estadístico no paramétrico. La probabilidad de las diferencias entre grupos se analizó con la prueba de Kruskal-Wallis. Las diferencias entre grupos se analizaron con la prueba de comparación múltiple de Dunn. Las relaciones entre dos parámetros fueron investigados utilizando la prueba de correlación de rangos de Spearman.

Se utilizó el programa GraphPad Prism (versión 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) para todos los análisis estadísticos. La significancia estadística se definió con una $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

7.1 Características demográficas clínicas de los pacientes estudiados.

Tabla 4. Características demográficas clínicas de los tres grupos de pacientes estudiados.

	Cardiopatía	Enfermedad Mega Esófago	Trastornos del ritmo	Trastornos de conducción	Disnea	Hallazgos ECO
Sujetos Sanos	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	Corazón Sano
Indeterminados	0/11	0/11	11/11	02/11	0/11	Corazón Sano
CCC	11/11	0/11	11/11	11/11	11/11	Dilatación de las 4 cavidades
MDI	11/11	0/11	11/11	5/11	11/11	Dilatación de las 4 cavidades

7.2 Caracterización fenotípica de las subpoblaciones de origen linfóide y mielóide.

El análisis inicial consistió en jerarquizar los distintos estados de maduración de las poblaciones celulares estudiadas. Con este objetivo se analizó la expresión de cada marcador de manera individual referidos a las células totales adquiridas. Los datos mostrados representan porcentajes de células positivas para la población total. La caracterización fenotípica de las distintas subpoblaciones de origen linfóide (CD3⁺ totales, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺/CD8⁺) y mieloides (CD33⁺, CD14⁺, CD11b⁺, CD11c⁺) así como el marcador de activación HLA-DR, se llevó a cabo en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con la enfermedad de Chagas en las etapas indeterminada y crónica, así como en sujetos con miocardiopatía dilatada idiopática y sujetos sanos como grupo control. El análisis de las subpoblaciones estudiadas se realizó a partir de una ventana en la cual se agrupan los tipos celulares por tamaño y complejidad [Forward Scatter (FSC) vs. Side Scatter (SSC)]; las poblaciones de origen mielóide se seleccionaron a partir de una ventana inicial (FSC vs. SSC) analizando la expresión de cada marcador estudiado (Figura 17a). Para las poblaciones de origen linfóide se seleccionó la población CD3⁺ y posteriormente se seleccionaron las células CD4⁺ y CD8⁺ (Figura 17b). La frecuencia de estas subpoblaciones se describe en la tabla 5 y en la Figura 18. Encontramos que dentro

de las subpoblaciones de origen linfoide, la población CD3⁺/CD8⁺ se encontró disminuida significativamente en los pacientes con CCC, indeterminados y MDI con respecto a sujetos control [% de células positivas de CCC, 19.5 (13.7-37.2); vs. control 42.21 (26.5-64.4) $P<0.0005$; % de células positivas de indeterminados 28.5 (13.7-37.2) vs. control 42.1 (26.5-64.4) $P<0.05$]; % de células positivas de pacientes con MDI 18.15 (15.0-32.2) vs. Control 42.1 (26.5-64.4) (Figura 18c). Se observó también una inversión de la relación CD4:CD8 en los sujetos con CCC respecto de los sujetos control [3.03 (1.46-7.16) vs. control 1.11 (0.39-2.16) $P<0.0005$] (Figura 18d). En los marcadores de origen mieloide estudiados solo se observó una diferencia significativa en el marcador CD11c en los sujetos con CCC e indeterminados respecto a sujetos control [% de células positivas de CCC 0.2070 (0.1-0.508) vs. control 0.0610 (0.0180-0.2610) $P<0.05$; indeterminados, 0.1770 (0.1420-1.250) vs. control 0.0610 (0.0180-0.2610) $P<0.05$] (Figura 19d). La expresión del marcador de activación HLA-DR, solo mostró diferencias entre los sujetos MDI vs. Sujetos indeterminados [%de células positivas de los sujetos con MDI 17.8 (11.2-20) vs. indeterminados 27.9 (16.2-40.6)]

Tabla 5. Frecuencia de las subpoblaciones de origen linfoide y mieloide.

Marcador	% de células positivas del total				P**
	Control	Indeterminada	CCC \oplus	MDI ψ	
CD33⁺	6.470 (0.55-22.80)	11.50 (6.44-17)	11.20 (2.48-15.9)	6.87 (4.3-10.10)	<i>Indeterminados vs MDI P<0.03</i>
CD14⁺	6.100 (1.51-14.5)	7.470 (0.556-22.7)	5.650 (1.31-11.4)	5.45 (3.4-8.1)	N.S.
CD11b⁺	9.760 (2.59-21.2)	9.200 (4.85-24.0)	9.340 (2.36-13.7)	5.49 (3.1-7.3)	<i>Indeterminados vs MDI P<0.01</i>
CD11c⁺	0.061 (0.018-0.261)	0.177 (0.142-1.25)	0.207 (0.1-0.508)	0.135 (0.121-0.222)	<i>CCC vs. Control, P<0.05; Indeterminados vs. Control P<0.05.</i>
HLA-DR⁺	22.4 (5.1-30.8)	27.90 (16.2-40.6)	24.00 (11.1-40.1)	17.80 (11.2-20.0)	<i>Indeterminados vs MDI P<0.007</i>
CD3⁺	32.9 (13.8-63.8)	42.60 (15.1-51.1)	39.70 (26.6-58.3)	51.6 (39.6-57.6)	<i>CCC vs. MDI, P<0.05; Indeterminados vs. MDI P<0.002; Control vs MDI P<0.05</i>
CD3⁺/CD4⁺	46.8 (25-57.3)	55.20 (40.9-74.9)	57.40 (45-84.5)	50.05 (39.9-59.3)	N.S.
CD3⁺/CD8⁺	42.1 (26.5-64.4)	28.55 (13.7-37.2)	19.50 (10-31)	18.15 (15.0-32.2)	<i>CCC vs. Control P<0.0005, MDI vs. Control P<0.0001</i>
CD4:CD8	1.11 (0.39-2.16)	1.865 (1.2-5.47)	3.03 (1.46-7.16)	3.0 (1.46-7.16)	<i>CTL vs. CCC P<0.005</i>

Valores expresados en mediana y valores mínimos y máximos. **CCC \oplus** : Cardiopatía Chagásica Crónica; **MDI ψ** : Miocardiopatía dilatada idiopática; **P****: Valor de P; **NS**: No significativo

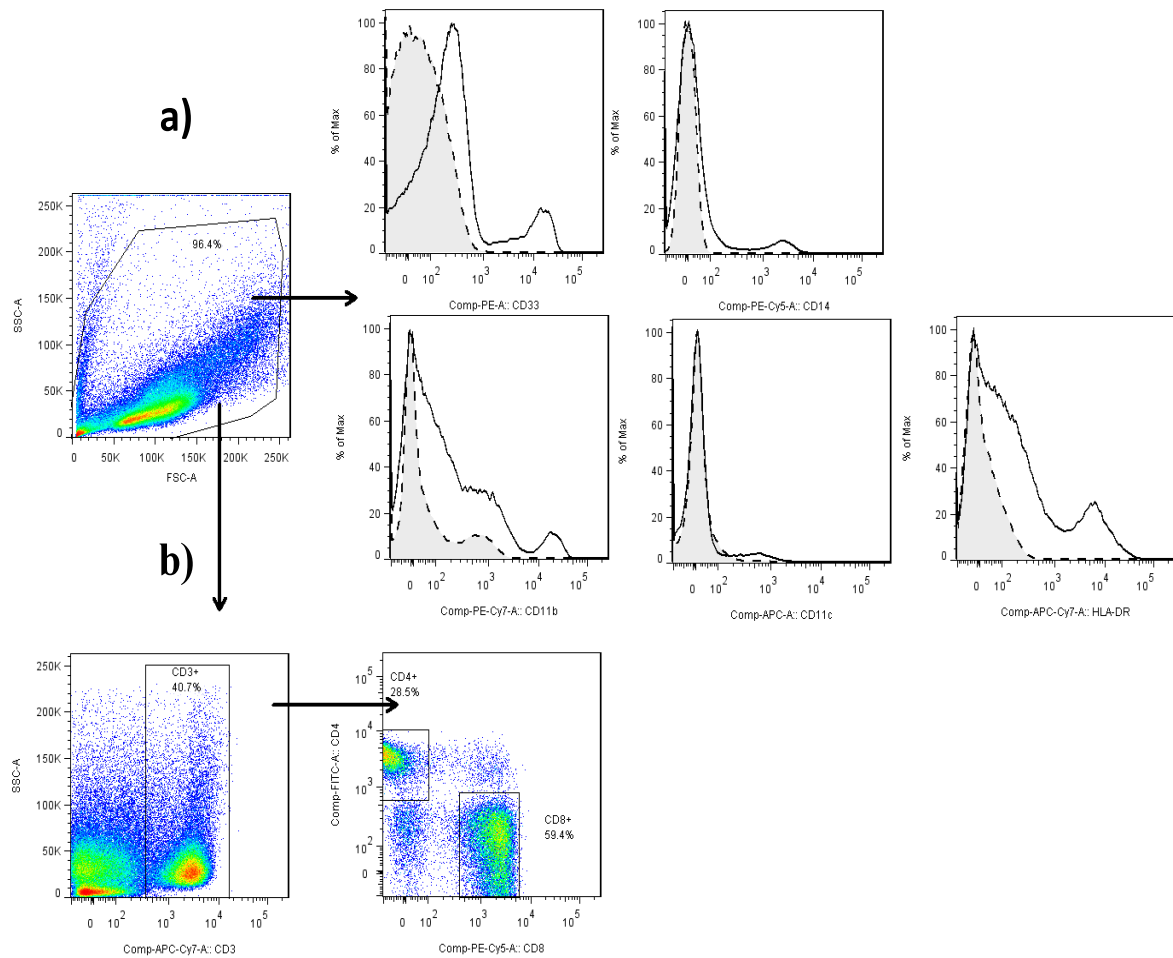


Figura 17. Estrategia de análisis por citometría de flujo. La población de estudio se seleccionó a partir de una ventana en la cual se agruparon los tipos celulares por tamaño y complejidad (FSC vs. SSC) (Gráfica de puntos). a) Para las estirpes mieloides se buscaron los marcadores CD33, CD14, CD11b, CD11c (histogramas). b) En la población linfóide se seleccionó una ventana de FSC vs. SSC y posteriormente la población que expresaba el marcador CD3 y dentro de la población positiva para este marcador se analizaron las células CD4⁺ y CD8⁺. Se analizó también el marcador de activación HLA^{DR}.

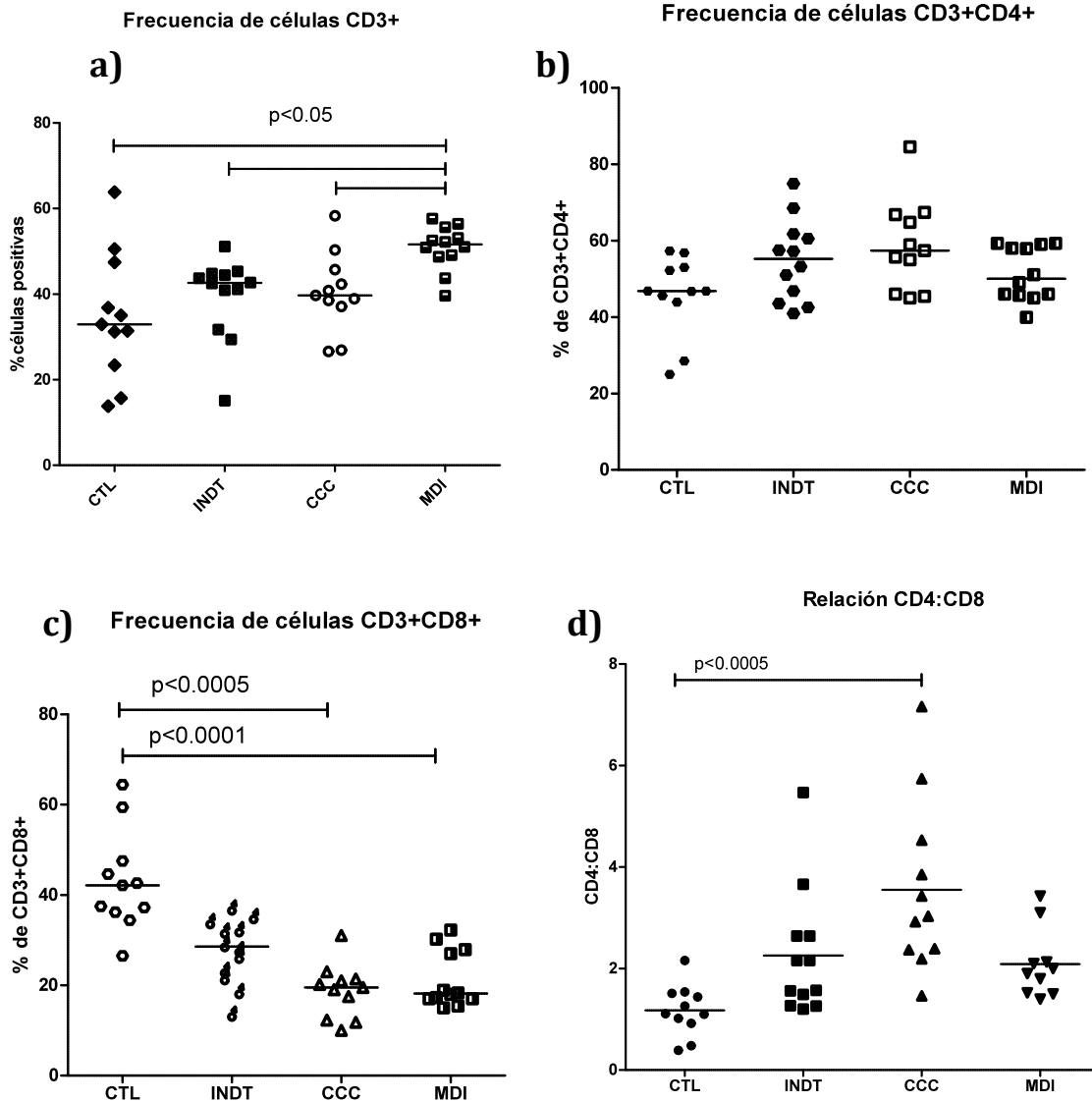


Figura 18. Frecuencia de las subpoblaciones caracterizadas a partir de la estirpe linfoide. a) No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de células CD3⁺ totales en ningún grupo de pacientes con la enfermedad de Chagas; encontramos un incremento significativo en el porcentaje de células CD3⁺ de los MDI con respecto del grupo control $P < 0.05$ y con respecto de los sujetos chagásicos indeterminados $p < 0.002$ y con respecto de los CCC $p < 0.005$. b) No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células CD3⁺CD4⁺ en ninguno de los grupos estudiados. c) La población CD3⁺CD8⁺ se encontró disminuida significativamente en pacientes con CCC e indeterminados con respecto a sujetos control. CCC vs. Control $P < 0.0005$; % indeterminados vs. Controles $P < 0.05$. d) Se observó una inversión de la relación CD4:CD8 en los sujetos con CCC respecto de los sujetos control (CCC vs. controles $P < 0.0005$). **CTL:** Control; **INDT:** Indeterminados; **CCC:** Cardiopatía Chagásica Crónica; **MDI:** Miocardiopatía dilatada idiopática.

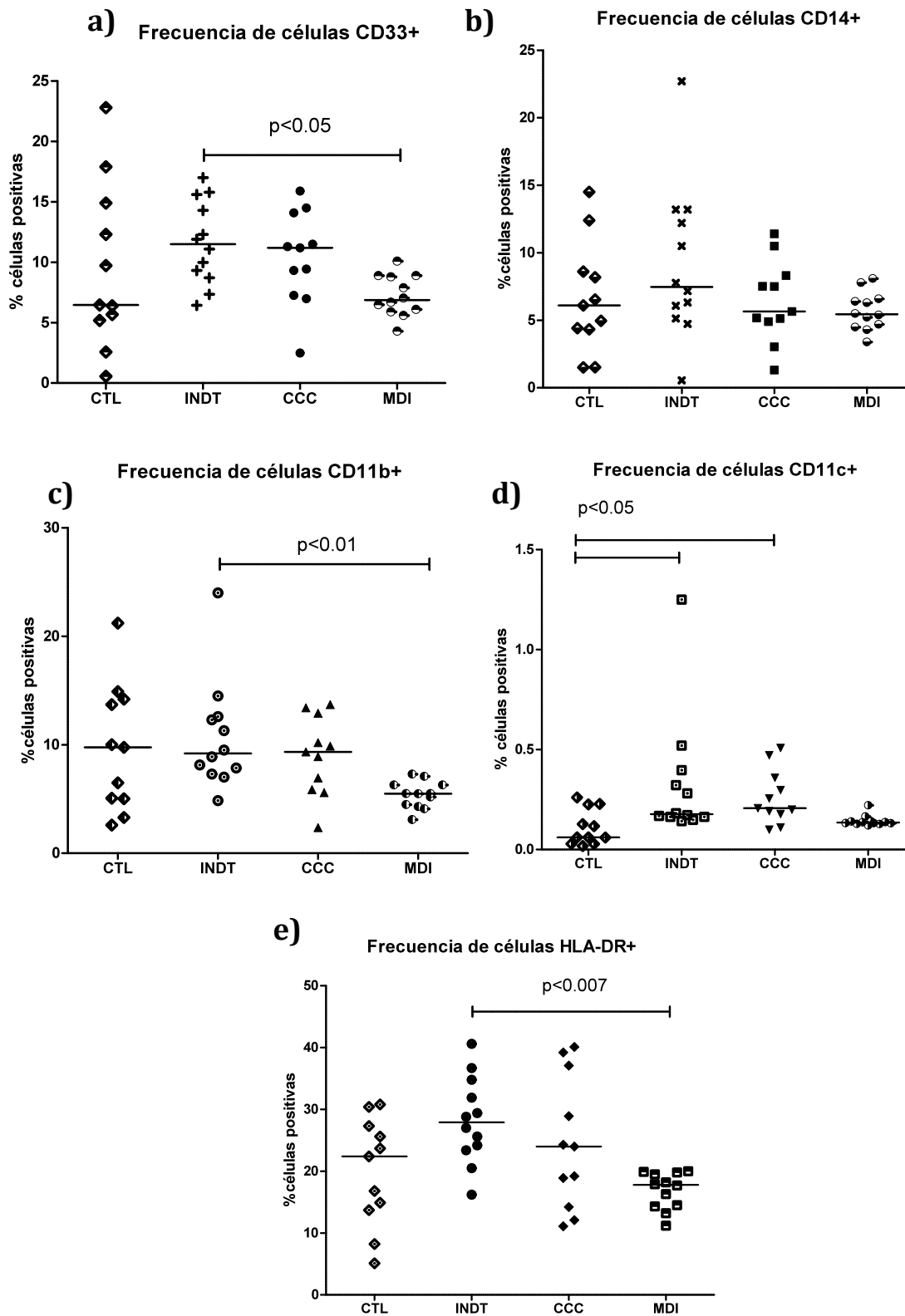


Figura 19. Frecuencia de las subpoblaciones de origen mieloide. **a, b, c)** No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de células CD33⁺, CD14⁺ o CD11b⁺ en ninguno de los grupos estudiados. **d)** Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células CD11c⁺ entre el grupo de CCC vs. CTL $P < 0.05$ y entre el grupo IND vs. CTL, $P < 0.05$. **e)** No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células HLA-DR⁺ entre los pacientes chagásicos y los sujetos sanos. **CTL:** Control; **IND:** Indeterminados; **CCC:** Cardiopatía Chagásica Crónica; **MDI:** Miocardiopatía dilatada idiopática.

7.3 Expresión de IFN- γ y TNF- α total y en las subpoblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺.

Las citocinas IFN- γ y TNF- α se determinaron intracelularmente en la población total y en las subpoblaciones CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ respectivamente. El IFN- γ total se encontró significativamente incrementado en los sujetos con CCC comparados con los sujetos controles [% de células positivas 1.255 (0.3-3.6%) vs. Controles 0.427 (0.32-2.24) $p < 0.05$] (Tabla 6, Figura 20a). Respecto a la expresión de las mismas citocinas en la subpoblación CD3⁺CD4⁺, el IFN- γ mostró un incremento significativo en los pacientes con CCC respecto a los pacientes con MDI [% de células positivas 46 (28.8-65) vs. MDI 11.2 (3.7-15.6) $p < 0.05$] (Figura 20c). Las células CD4⁺/TNF- α ⁺ mostraron una disminución significativa en los sujetos con CCC comparado con el grupo control [% de células positivas 1.8 (0.16-4.83) vs. Controles 9.31 (1.27-20.1) $p < 0.05$] (Figura 20d). Las células CD8⁺IFN- γ ⁺ de los sujetos con MDI mostraron una disminución significativa respecto al grupo control, al grupo de pacientes indeterminados y con CCC [% de células positivas 0.73 (0.31-1.3) vs. controles 15.8 (1.67-47.60), indeterminados 16.35 (3.23-45.9), CCC 12.3 (1.69-24.2) $p < 0.05$] (Figura 20e). El TNF- α se encontró incrementado en las células CD3⁺CD8⁺ de los pacientes con MDI comparados con sujetos con CCC, indeterminados y controles [% de células positivas 68.0 (43-81) vs. CCC 21.8 (5.8-43.4) < 0.005 ; indeterminados, 22.85 (6.89-40.7) < 0.05 ; controles 21.5 (9.3-69.7) $p < 0.05$] (Figura 20f).

Tabla 6. Expresión de $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$ total y en las poblaciones de células T $CD4^+$ y T $CD8^+$.

	% de células positivas				P**
	Control	Indeterminada	CCC\oplus	MDI ψ	
$IFN\gamma$ total	0.4270 (0.32-2.24)	0.8350 (0.123-2.3)	1.255 (0.3-3.6)	1.65 (0.9-2.2)	CCC vs. controles, $P < 0.05$ MDI vs controles $P < 0.005$
$TNF\alpha$ total	0.25 (0.143-2.78)	0.4085 (0.04-0.63)	0.73 (0.01-0.89)	0.91 (0.09-1.3)	Indeterminado vs MDI $P < 0.004$
$CD4^+IFN\gamma$	58.4 (17.7-82.8)	48.05 (19.8-63.5)	46 (28.8-65)	11.2 (3.7-15.6)	Controles vs MDI $P < 0.005$; CCC vs. MDI $P < 0.05$; Indeterminado vs MDI $P < 0.005$
$CD4^+TNF\alpha$	9.31 (1.27-20.1)	2.205 (0.386-4.89)	1.8 (0.16-4.83)	13.3 (3.5-26.2)	Indeterminados vs. Controles, $P < 0.05$; CCC vs. Controles, $P < 0.005$; indeterminados vs. MDI, 0.05; CCC vs. MDI, $P < 0.005$
$CD8^+IFN\gamma$	15.80 (1.67-47.60)	16.35 (3.23-45.9)	12.30 (1.69-24.20)	0.73 (0.31-1.3)	Control vs. MDI e INDT vs .MDI $P < 0.05$; CCC vs MDI $P < 0.05$
$CD8^+TNF\alpha$	21.5 (9.3-69.70)	22.85 (6.89-40.70)	21.80 (5.8-43.40)	68.0 (43-81)	Control vs. MDI $p < 0.05$; Indeterminado vs MDI $P < 0.05$; CCC vs MDI $P < 0.005$

Valores expresados en mediana y valores mínimos y máximos. **CCC \oplus** : Cardiopatía Chagásica Crónica; **MDI ψ** : Miocardiopatía dilatada idiopática; **P****: Valor de P; **NS**: No significativo.

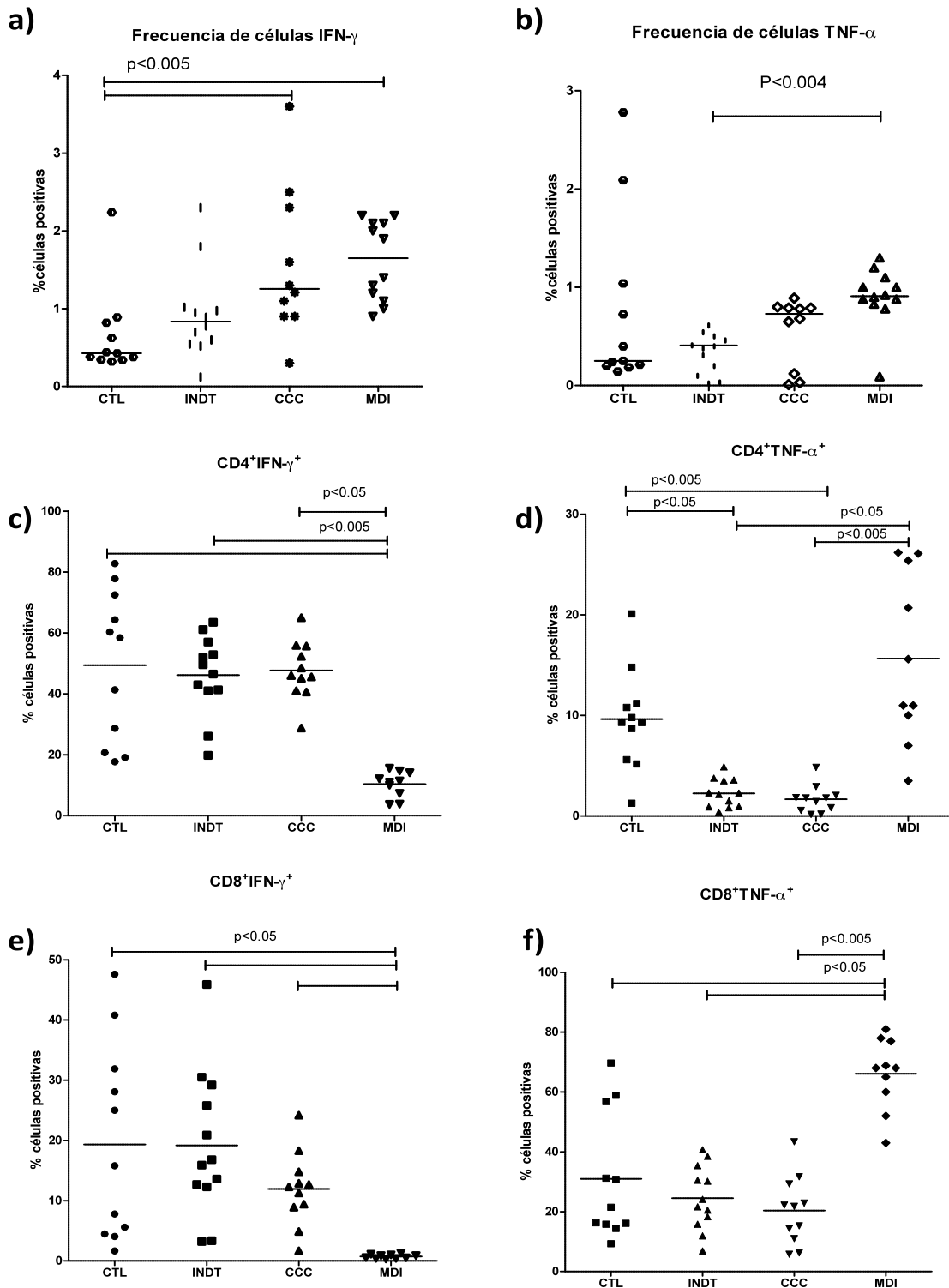


Figura 20. Expresión de IFN γ y TNF α en la población celular total y en las subpoblaciones CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺. a) Y b) Se muestran las frecuencias de expresión para IFN γ y TNF α en la población celular total. c) y d) Se muestra la expresión de las mismas citocinas en la subpoblación CD3⁺CD4⁺. e) y f) Muestran la expresión de las citocinas estudiadas en las células CD3⁺CD8⁺. Las cifras se muestran como porcentaje de células positivas.

7.4 Análisis fenotípico de la subpoblación de MDSCs

En concordancia con el análisis inicial para la caracterización de población reportada en la literatura como mieloides supresoras, éste se realizó sobre la población CD33⁺, analizando la expresión del marcador CD11b y CD14. El fenotipo inicial se definió entonces como CD33⁺/CD11b⁺/CD14⁻. El análisis entre los distintos grupos estudiados mostró una diferencia significativa entre el grupo de los sujetos con CCC, en el cual esta población tuvo un incremento con respecto al grupo control [% de células positivas en pacientes con CCC, 24.3 (11.3-48) vs. controles, 7.83 (1.05-23.3) *P*<0.005] (Tabla 7); también se observaron diferencias significativas entre los sujetos con CCC vs. Sujetos con MDI [% de células positivas en pacientes con MDI, 10.9 (3.7-16.5) vs. CCC, 24.3 (11.3-48). Posteriormente, se analizó la frecuencia de células que expresaban los marcadores CD33⁺/CD14⁻/CD11b⁺/HLA⁻DR⁻ y la presencia de la enzima iNOS en esta subpoblación celular así como en la población celular total (Tabla 7; Figura 21a, 21b). La estrategia de análisis para la caracterización de esta subpoblación CD33⁺/CD14⁻/CD11b⁺/HLA⁻DR⁻/iNOS⁺ se muestra en la Figura 21c. La frecuencia de la subpoblación CD33⁺/CD14⁻/CD11b⁺/HLA⁻DR⁻/iNOS⁺ se encontró incrementada en los pacientes con CCC respecto a los sujetos control [% de células positivas, 1.99 (1.33-6.9) vs. control 0.844 (0.318-3.76), *P*<0.005] (Tabla 7; Figura 21b). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células CD33⁺/CD14⁻/CD11b⁺/HLA⁻DR⁻/iNOS⁺ en los pacientes con CCC vs. MDI. La expresión de iNOS en la población celular total, no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados (Tabla 7; Figura 21a).

Tabla 7. Frecuencia de las subpoblación de células CD33⁺/CD14⁻/CD11b⁺/HLA⁻DR⁻/iNOS⁺, células CD33⁺/CD14⁻/CD11b⁺/HLA⁻DR⁻/iNOS⁺/NO⁺, iNOS y NO⁺ total.

Subpoblación	% de células positivas				P**
	Control	Indeterminada	CCC⊕	MDIψ	
CD33 ⁺ /CD11b ⁺ /CD14 ⁻	7.83 (1.05-23.3)	13.8 (9.05-25.9)	24.3 (11.3-48)	10.9 (3.7-16.5)	CCC vs. controles <i>P</i> <0.005 CCC vs MDI <i>P</i> <0.0005
CD33 ⁺ /CD14 ⁻ /CD11b ⁺ /HLA ⁻ DR ⁻ /iNOS ⁺	0.844 (0.318- 3.76)	1.455 (0.432-2.3)	1.990 (1.3-6.9)	2.490 (0.78-6.1)	CCC vs. Controles <i>P</i> <0.005
CD33 ⁺ /CD14 ⁻ /CD11b ⁺ /HLA ⁻ DR ⁻ /NO ⁺	70.90 (16.1-84.2)	83.25 (2.93-96.2)	89.70 (50-96.5)	53.75 (31.2-67.0)	CCC vs. controles <i>P</i> <0.05; Indeterminado vs. MDI <i>P</i> <0.005 CCC vs MDI <i>P</i> <0.0001
iNOS ⁺ total	79.90 (50.5-99.4)	70.35 (24.3-85.2)	62.70 (36.9-96.7)	90.35 (21.0-942.9)	N.S.
NO ⁺ total	56.6 (42.6-72.2)	79.9 (4.49-94.6)	86.9 (55.7-91.3)	41 (21-55.5)	CCC vs. Controles <i>P</i> <0.005 Indeterminado vs. MDI, <i>P</i> <0.005; CCC vs. MDI, <i>P</i> <0.005
Subpoblación	Intensidad Media de Fluorescencia (IMF)				
NO ⁺ total	2839 (1440- 6230)	45800 (13 300-71900)	47400 (18300- 62280)	1659 (123-3198)	Indeterminados vs controles, <i>P</i> <0.0005; CCC vs. Controles, <i>P</i> <0.005, indeterminados vs. MDI, <i>P</i> <0.005; CCC vs. MDI <i>P</i> <0.05.
CD33 ⁺ /CD14 ⁻ /CD11b ⁺ /HLA ⁻ DR ⁻ /iNOS ⁺ /NO ⁺	134000 (113000- 213500)	98959 (10800-186500)	213014 (69100- 395300)	3765 (2893-6574)	MDI vs. controles <i>P</i> <0.05; Indeterminado vs. CCC <i>P</i> <0.005; CCC vs. MDI <i>P</i> <0.005

Valores expresados en mediana y valores mínimos y máximos. CCC⊕: Cardiopatía Chagásica Crónica; MDIψ: Miocardiopatía dilatada idiopática; P**: Valor de P; NS: No significativo

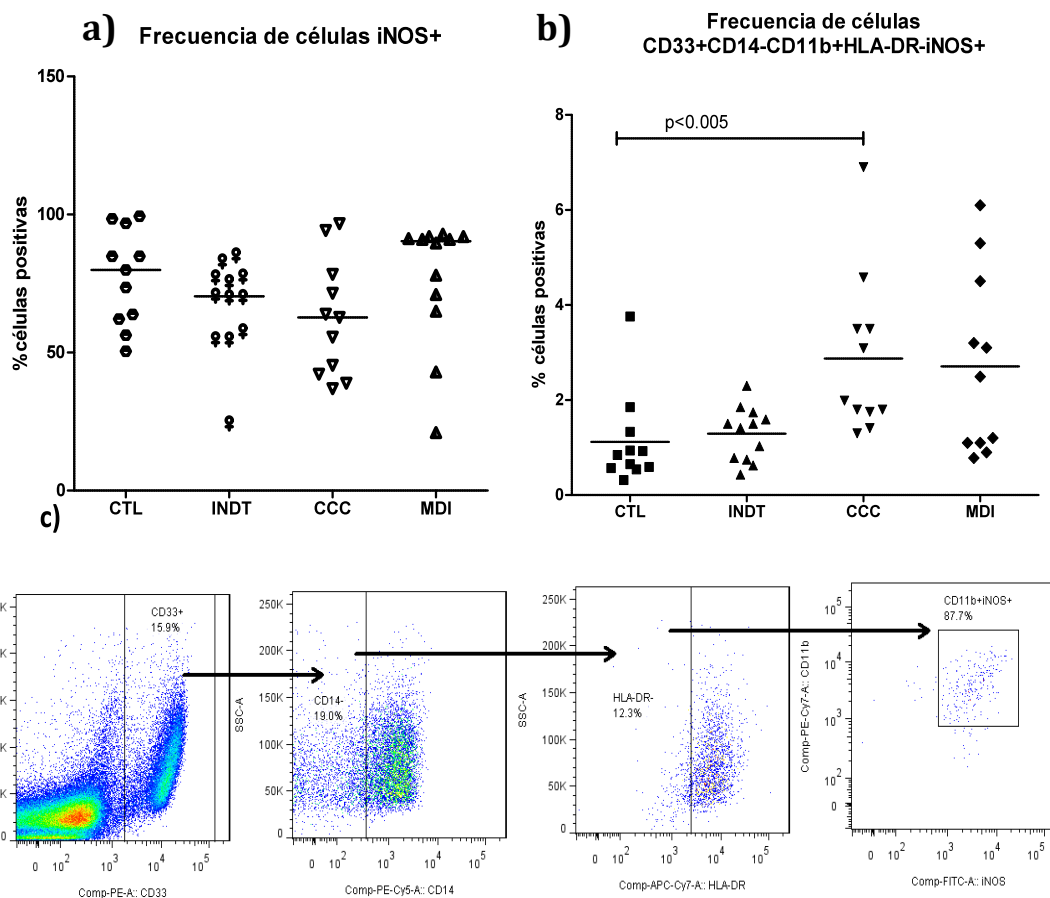


Figura 21. Análisis de la subpoblación mielode supresora y de la presencia de enzima iNOS. **a)** Expresión de la enzima iNOS⁺ total, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados. **b)** Frecuencia de la subpoblación CD33⁺/CD14⁻/CD11b⁺/HLA-DR⁻/iNOS⁺. Se observó un aumento de la población en los pacientes con CCC con respecto a los sujetos control, $P<0.005$. **c)** Estrategia de análisis para la caracterización de la subpoblación CD33⁺/CD14⁻/CD11b⁺/HLA-DR⁻/iNOS⁺, a partir de una ventana Forward Scatter (FSC) vs. Side Scatter (SSC) se seleccionó la población CD33⁺ y de ésta se seleccionó la población CD14⁻ en la cual se analizó la expresión del marcador HLA-DR seleccionando la población negativa para este marcador, en ésta última población se analizó la expresión de los marcadores CD11b⁺ e iNOS⁺. **CTL:** Control; **INDT:** Indeterminados; **CCC:** Cardiopatía Chagásica Crónica; **MDI:** Miocardiopatía dilatada idiopática.

7.5 Expresión de NO en la subpoblación CD33⁺/CD14⁻/CD11b⁺/HLA-DR⁻.

Se estudió la producción de NO en la población total de células (Figura 22a, 22b) así como en la subpoblación CD33⁺/CD14⁻/CD11b⁺/HLA-DR⁻ (Tabla 7, Figura 22c, 22d).

El análisis de la frecuencia de células positivas para óxido nítrico total mostró un incremento significativo entre el grupo CCC y el grupo de control [% de células positivas en sujetos con CCC, 86.9 (55.7-91.3) vs. controles, 56.6 (42.6-72.2) $P<0.005$; y entre el grupo CCC y MDI [% de células positivas en sujetos con CCC,

86.9 (55.7-91.3) vs sujetos con MDI, 41 (21-55.5) $P<0.005$, (Figura 22a). El análisis de la intensidad media de fluorescencia en las mismas subpoblaciones también mostró un incremento significativo entre los pacientes con CCC respecto a los controles [Intensidad media de fluorescencia en pacientes con CCC, 47400 (18300-62280) vs controles, 2839 (1440-6230) $P<0.005$] así como entre los indeterminados con respecto a los controles $P<0.0005$ y los pacientes con MDI con respecto de los sujetos con CCC (Figura 22b). Al estudiar el NO en la población celular con el fenotipo específico de las células de origen mieloide referidas como supresoras en la literatura ($CD33^+/CD14/CD11b^+/HLA-DR^-$), se encontró un aumento significativo en el porcentaje de células que expresaban NO en el grupo de pacientes con CCC con respecto al grupo control [% de células positivas para NO, 89.7 (50-96.5) vs. control 70.9 (16.10-84.2) $P 0.05$], no encontrando diferencias entre sujetos indeterminados y crónicos (Figura 22c, tabla 7). Sin embargo, el análisis de la intensidad media de fluorescencia del NO en la población de las células con fenotipo supresor, sí mostró un incremento significativo en los pacientes con CCC con respecto a los pacientes indeterminados [Intensidad media de fluorescencia, en pacientes con CCC, 134000 (113000-213500) vs pacientes indeterminados, 98959 (10800-186500) $P<0.005$ (Figura 22d). Se vio un incremento significativo en el porcentaje de células con fenotipo supresor que expresaban NO en los sujetos con CCC [% de células positivas para NO 89.7 (50-96.5) vs. sujetos con MDI [% de células positivas para NO, 53.75 (31.2-67)] (Tabla 7).

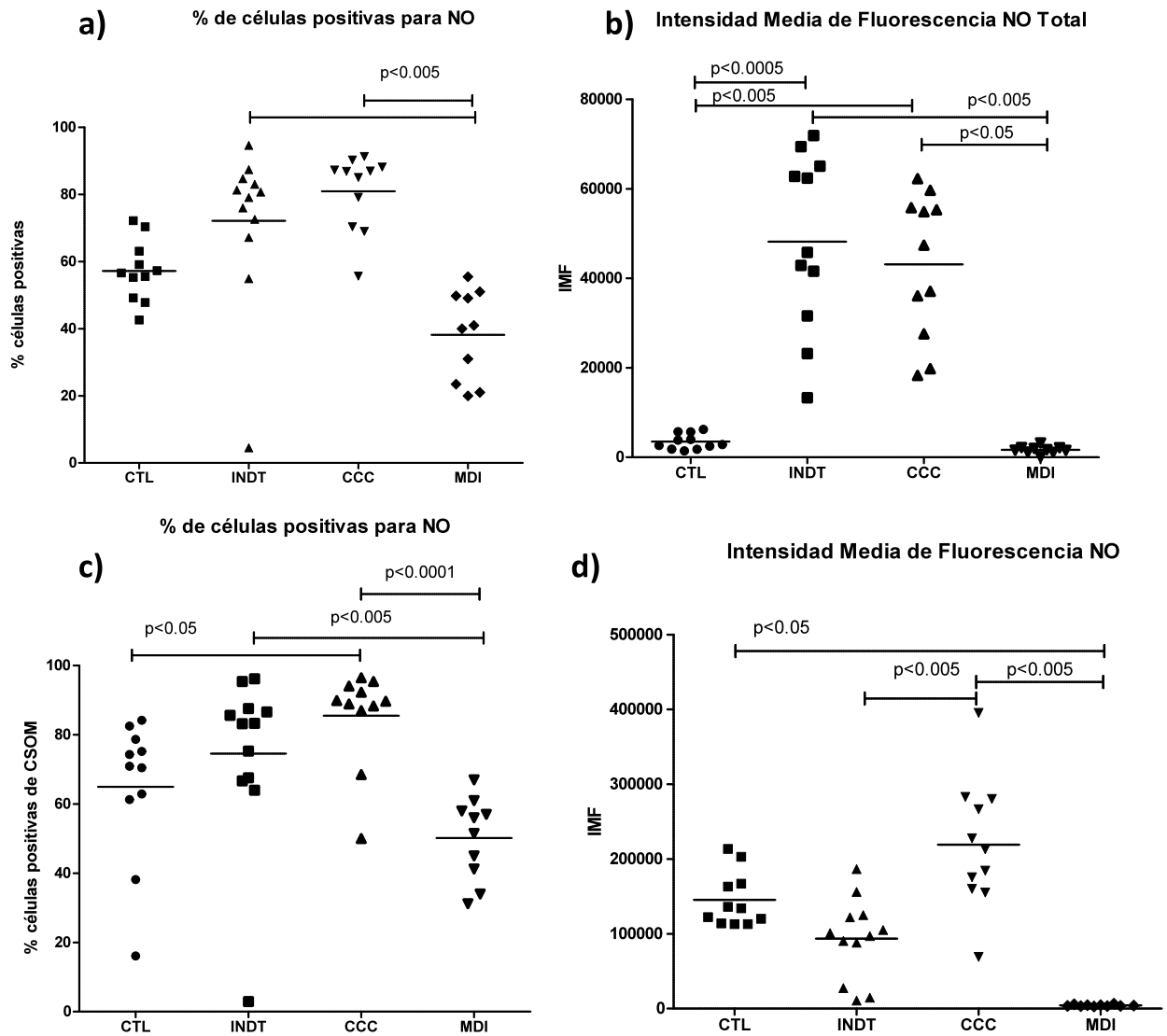


Figura 22. Análisis de la expresión total de NO total y en la subpoblación CD33⁺/CD14⁻/CD11b⁺/HLA⁻DR⁻. **a)** % total de células positivas para NO, se observó un incremento significativo entre el grupo CCC con respecto al grupo con control (P<0.005); así como entre el grupo con CCC y el grupo con MDI (P<0.005). **b)** Intensidad media de fluorescencia de NO total, se observaron también diferencias significativas entre el grupo de pacientes indeterminados con respecto al grupo control (P<0.0005) y entre los sujetos indeterminados con respecto al grupo MDI (P<0.005). **c)** No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células supresoras mieloides (CSOM, siglas en la imagen), entre los grupos estudiados. **d)** Intensidad media de fluorescencia en la subpoblación con fenotipo supresor (CSOM), se muestra un incremento significativo en los sujetos con CCC vs. sujetos indeterminados. **CTL:** Control; **INDT:** Indeterminados; **CCC:** Cardiopatía Chagásica Crónica; **MDI:** Miocardiopatía dilatada idiopática; **CSOM:** Células supresoras de Origen Mieloide.

7.6 Cuantificación de arginasa-1 en los grupos de pacientes estudiados

Se encontró un incremento significativo en los pacientes con CCC respecto a los controles sanos y con respecto a los pacientes indeterminados [nivel de arginasa en pacientes con CCC, 14.48 (3.08-25.19 ng/ml) vs. controles 6.48 (1.8-9.91) $p < 0.05$; indeterminados 6.05 (0.77-10.97 ng/ml), $P < 0.05$]. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los sujetos con MDI comparados con los sujetos con CCC, sin embargo hay una tendencia en los sujetos con CCC a tener mayores niveles de arginasa cuando se comparan con MDI [pacientes con MDI 6.73 (1.99-10.2) vs. CCC 14.48 (3.08-25.19), (Tabla 8, Figura 23).

Tabla 8. Niveles de Arginasa 1.

	GRUPOS ESTUDIADOS				P**
	Control	Indeterminados	CCC⊕	MDI ψ	
Niveles de Arginasa ¹ (ng/ml)	6.48 (1.8-9.91)	6.05 (0.77-10.97)	14.48 (3.08-25.19)	6.73 (1.99-10.20)	Control vs. CCC $P < 0.05$; CCC vs. indeterminados, $P < 0.05$

Se observó un incremento significativo en los pacientes con CCC con respecto de los controles sanos y con respecto de los pacientes indeterminados, $P < 0.05$.

(Valores expresados en mediana y rangos en ng/ml). **CCC⊕**: Cardiopatía Chagásica Crónica; **MDIψ**: Miocardiopatía dilatada idiopática; **P****: Valor de P; **NS**: No significativo

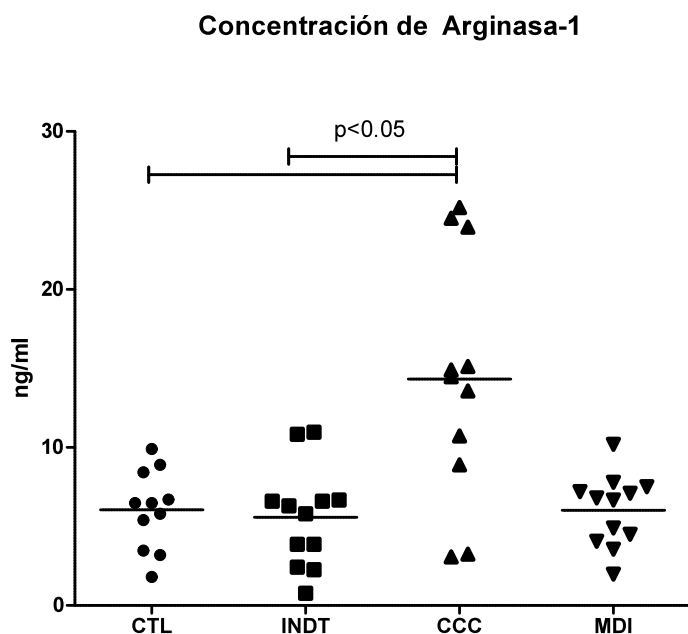


Figura 23. Cuantificación de niveles de Arginasa 1. Se observó un incremento significativo en los pacientes con CCC con respecto de los pacientes indeterminados ($P < 0.05$).

7.7 Actividad de arginasa total en plasma en los diferentes grupos de pacientes con la enfermedad de Chagas.

La actividad de arginasa total se cuantificó en plasma en todos los grupos estudiados; se encontraron diferencias significativas entre los pacientes indeterminados y con CCC vs. Controles, [Indeterminados, 32.25 (18-60.30 U/L) vs. controles, 2.72 (1-7.66 U/L), $P < 0.005$; CCC vs. controles, $P < 0.0005$]; [actividad de arginasa en los pacientes con CCC, 38.50 (10.30-85 U/L) vs. controles $P < 0.0005$]. (Tabla 9, Figura 24). Al comparar a los dos grupos chagásicos contra los MDI, ambos tuvieron una actividad significativamente incrementada $p < 0.05$.

Tabla 9. Cuantificación de la actividad de arginasa total en plasma.

	GRUPOS ESTUDIADOS				P**
	Control	Indeterminada	CCC⊕	MDI ψ	
Actividad de Arginasa total U/L	2.72 (1-7.66)	32.25 (18-60.30)	38.50 (10.30-85)	0.9 (0.13-5.1)	Indeterminados vs. Controles $P < 0.005$; CCC vs. controles, $P < 0.0005$; Indeterminados vs. MDI, $P < 0.05$; CCC vs. MDI, $P < 0.05$.

Actividad medida en Unidades de Arginasa por litro; 1 unidad de arginasa convierte 1 μmol de L-arginina en ornitina y urea por minuto a pH 9.5 y 37°C. Se encontró un incremento en la actividad de arginasa en los pacientes indeterminados y los pacientes con CCC, con respecto a los sujetos control (Indeterminados vs. controles $P < 0.005$; CCC vs. controles, $P < 0.0005$) y con respecto a los sujetos con MDI $P < 0.05$. (Valores expresados en mediana y valores mínimos y máximos U/L). **CCC⊕**: Cardiopatía Chagásica Crónica; **MDIψ**: Miocardiopatía dilatada idiopática; **P****: Valor de P; **NS**: No significativo.

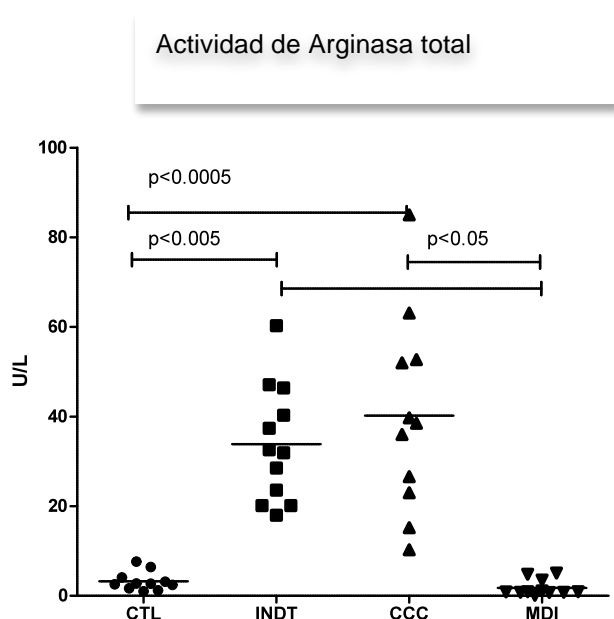


Figura 24. Cuantificación de la actividad Enzimática de Arginasa. Este análisis mostró un incremento significativo en la actividad enzimática de arginasa en los pacientes con INDT y CCC respecto a los sujetos control ($p < 0.005$ y $p < 0.0005$ respectivamente).

7.8 Correlación de las MDSCs y las células CD3⁺CD8⁺

Con objeto de determinar si el incremento de las poblaciones mieloides estudiadas se correlacionaba con la disminución de las células CD3⁺CD8⁺, se realizó un análisis que mostró una correlación negativa entre el porcentaje de células linfoides CD3⁺CD8⁺ y el de células MSDC's ($r = 0.3993$) (Figura 25b). Se analizó también la posible correlación de la disminución de las células CD3⁺CD8⁺ y la subpoblación CD33⁺CD11b⁺CD14⁻ que se analizó inicialmente, ya que ésta también mostró un incremento significativo en los pacientes con CCC respecto al grupo control. [% de células positivas en pacientes con CCC, 24.3 (11.3-48) vs. controles, 7.83 (1.05-23.3) $P < 0.005$] (Tabla 10). Este análisis mostró que no existe una correlación entre ambas subpoblaciones (Figura 25a).

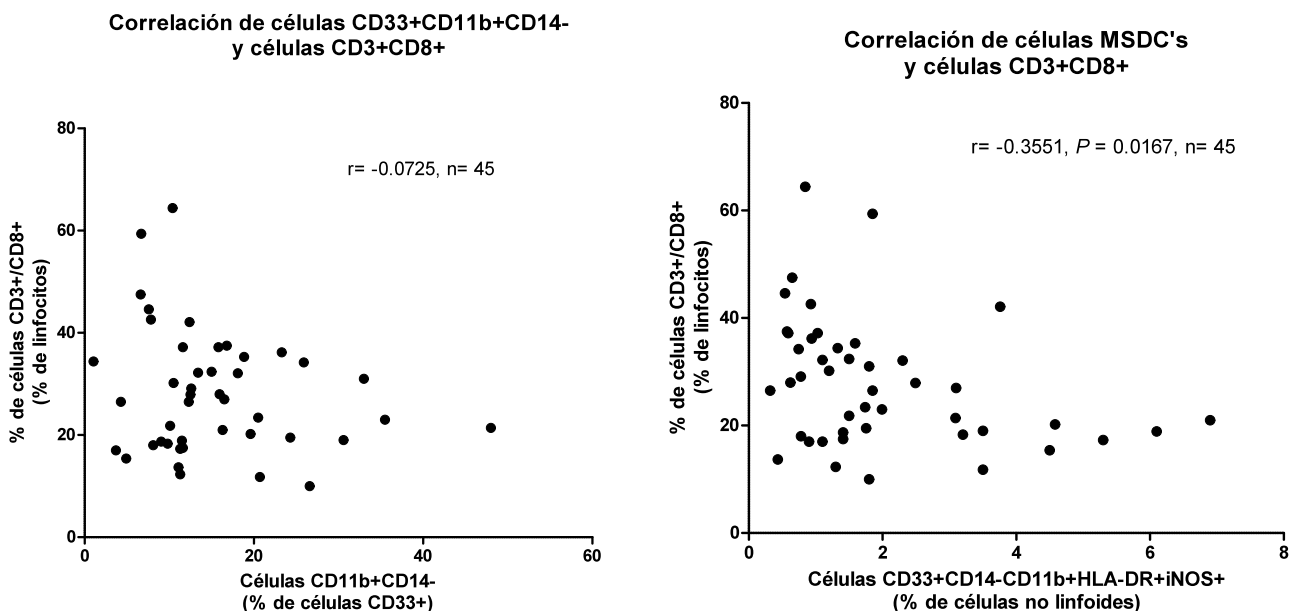


Figura 25. Análisis de la relación de las subpoblaciones de origen mieloide estudiadas y la subpoblación CD3⁺CD8⁺. Se encontró una correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la subpoblación MDSC's y CD3⁺CD8⁺, sin embargo el coeficiente de correlación ($r=0.4$), indica que existe una proporción de sujetos en los que esta tendencia no se cumple, al observar esta gráfica se identifica un pequeño subgrupo de sujetos con cifras bajas tanto para células linfoides como mieloides. **MSDC's:** Células supresoras de Origen Mieloide.

VIII. DISCUSIÓN

Las células supresoras de origen mieloides son una población heterogénea de células que consisten en células progenitoras mieloides y células mieloides inmaduras (IMCs). Están caracterizadas por su estado activado que es capaz de suprimir la respuesta de los linfocitos T a través de la alta expresión de las enzimas arginasa¹, NOS2, así como también un incremento en su producción de NO y especies reactivas de oxígeno. Esto da como resultado la expansión de una población de IMCs que tienen actividad supresora de las células T (108). Esta subpoblación celular fue identificada en un principio en pacientes con cáncer y actualmente en varias enfermedades infecciosas, sepsis, trauma, trasplante de medula ósea y algunas enfermedades autoinmunes (108) (150).

Este estudio mostró la presencia de una población celular mieloides, que de acuerdo a su fenotipo CD33⁺CD11b⁺CD14⁻HLA⁻DR⁻iNOS⁺, en la literatura se le atribuye una función supresora de la respuesta de células T (108); al respecto nosotros encontramos incrementada a esta subpoblación en células mononucleares de sangre periférica, en una patología crónica causada por el parásito intracelular *T. cruzi* [pacientes Chagásicos en etapa crónica cardíaca (CCC) vs. sujetos sanos], lo cual correlaciona con los hallazgos en otras patologías en donde esta subpoblación se expande y prolifera en respuesta a la persistencia antigénica o en respuesta a factores liberados por células cancerosas, los cuales son capaces de activar diversas vías de señalización en las células mieloides inmaduras que impiden su diferenciación hacia células maduras como macrófagos, células dendríticas y granulocitos maduros, pero inducen su proliferación en estado activado que se caracteriza por expresión elevada de las enzimas arginasa-1 y NOS2, las cuales

tienen un papel relevante en la supresión de células T mediada por estas células (151-153). Se ha visto que las MDSCs solo se expanden y proliferan en patologías de larga duración en las cuales es difícil alcanzar una cura (5, 7, 150). Nuestros resultados arrojan datos relevantes sobre una población de células que no se ha estudiado en humanos con enfermedad de Chagas, la cual es una patología sistémica y crónica en la que un 70% de los pacientes evolucionan a un estado crónico indeterminado que puede perdurar toda la vida, sin anomalías en los órganos que son afectados principalmente (corazón y sistema digestivo) y un 20 ó 30% evolucionan después de 10 ó 30 años, a una fase crónica cardíaca con megaformaciones en corazón y miocarditis que los lleva a la muerte (15, 25, 29). Por tanto, ya que la enfermedad de Chagas es una patología donde se mantiene una persistencia antigénica de larga duración, es lógico suponer que las MDSCs, que se sabe, proliferan bajo condiciones similares a las que se presentan en la enfermedad de Chagas, incrementan en porcentaje en los sujetos infectados con *T. cruzi*. La diferencia observada en el porcentaje de células supresoras de origen mielóide en los pacientes chagásicos con respecto de los sujetos sanos es consistente con los diversos trabajos publicados, que demuestran que esta población celular se incrementa en infecciones parasitarias (6, 7, 151, 152, 154, 155) y podría indicar un mecanismo a través del cual, los sujetos con CCC, en los que se tiene evidencia de que existe una respuesta inmune específica tipo Th1 inflamatoria, podría ejercer una respuesta regulatoria que busque evitar los efectos exacerbados de los mediadores de la respuesta inflamatoria, pero que en lugar de esto se obtenga solo una disfunción de los linfocitos T, lo que deja a los pacientes con CCC imposibilitados para mantener un control en la multiplicación del parásito.

Cuervo y col. han demostrado la existencia de una población de células mieloides que expresan arginasa I en el tejido cardíaco de ratones durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas (153); en el trabajo más reciente del mismo investigador, se mostró que células CD11⁺ del linaje granulocítico (Ly6G⁺) y monocítico (Ly6G⁻) -fenotipo que identifica a las MDSCs en ratón- estaban presentes en el tejido cardíaco de ratones infectados con la cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. El linaje monocítico inhibió la proliferación de las células T *in vitro* de manera dependiente de iNOS y encontraron niveles altos de expresión, tanto de arginasa 1 como iNOS, lo que demuestra la participación de estas dos enzimas en la supresión mediada por estas células. La expresión persistente de arginasa-1 llevó a la disminución en los niveles de L-arginina en plasma durante la infección aguda y la suplementación de los ratones infectados con L-arginina logró disminuir la carga parasitaria, lo cual demuestra que la depleción de la L-arginina durante la infección por *T. cruzi* regula a la baja la respuesta inmune. Estos hallazgos concuerdan con nuestros resultados de la determinación de los niveles de arginasa-1 en plasma de pacientes con enfermedad de Chagas en donde encontramos significativamente incrementada la concentración de dicha enzima en los sujetos con CCC vs. sujetos sanos. Al determinar la actividad de Arginasa total, tanto los sujetos con CCC como los pacientes indeterminados tuvieron incrementada significativamente la actividad de la arginasa total. Lo que demuestra por primera vez que la enzima arginasa puede tener un papel relevante en el resultado patogénico de la enfermedad de Chagas en humanos y quizá tenga relación con el incremento en la frecuencia de las células mieloides con fenotipo supresor identificada en este trabajo.

En muchos trabajos de investigación, principalmente en modelos experimentales en ratón, se ha demostrado el papel crucial de las células T CD8⁺ para el control de

la infección por *Trypanosoma cruzi* (99). Los ratones que carecen de células T CD8⁺ rápidamente sucumben a la infección o desarrollan una enfermedad crónica más severa. La producción disminuida de IFN γ en las células T CD8⁺, también se ha asociado al incremento en la severidad de la enfermedad crónica de la enfermedad de Chagas (99). Al respecto, nosotros encontramos que la subpoblación de células T CD8⁺ en sujetos con CCC estaba significativamente disminuida al compararla con sujetos sanos, dando como resultado un cambio en la relación CD4:CD8 entre estos dos grupos. Estos resultados sugieren que, la población mielóide con fenotipo supresor, identificada con mayor frecuencia en los pacientes con CCC vs. Sujetos sanos, es probablemente responsable de la disminución de la frecuencia de las células T CD8⁺, en los mismos pacientes con CCC. En el ratón, las células T CD8⁺ están disminuidas al inicio de la infección por *T. cruzi*, pero alcanzan niveles elevados durante la etapa crónica de la infección. En humanos dicha población es poco estudiada, sin embargo existen reportes a cerca de la disminución en la frecuencia y funcionalidad (156, 157). Es necesario, realizar estudios que nos permitan conocer el estado funcional de estas células en los pacientes con CCC y poder comparar los hallazgos con sujetos sanos, esto nos permitiría saber si las células T CD8⁺ en los sujetos con CCC, son capaces de responder y proliferar ante determinados estímulos, y poder así tener una evidencia que apoye la posible relación que existe entre el aumento de las células mieloides con fenotipo CD33⁺CD11b⁺CD14⁺HLA⁺DR⁺iNOS⁺ y la disminución de las células T CD8⁺.

IX. CONCLUSIONES

1. Se demostró que los pacientes con CCC presentan un incremento en la frecuencia de dos subpoblaciones con fenotipo supresor al compararlos con los sujetos sanos.
2. La frecuencia de las células CD8⁺ se encontró disminuida en los pacientes con CCC vs. controles lo cual cambio la relación CD4:CD8.
3. La enzima iNOS y la expresión de óxido nítrico se encontró incrementada solo en la subpoblación con fenotipo supresor CD33⁺CD14⁻CD11b⁺HLA-DR⁻ en los pacientes con CCC con respecto a los sujetos control. La expresión del óxido nítrico estuvo incrementada en ambas subpoblaciones supresoras estudiadas en los pacientes con CCC vs. sujetos control.
4. Hubo un incremento en el porcentaje de células totales que expresaban NO en los pacientes con CCC respecto a los sujetos sanos.
5. No hubo diferencia significativa en el porcentaje de células CD33⁺CD14⁻CD11b⁺HLA-DR⁻ que expresaban NO en pacientes indeterminados vs. CCC, sin embargo, la intensidad media de fluorescencia si mostró diferencias significativas entre estos dos grupos, lo que indica que el nivel de expresión de dicha molécula es mayor en las células CD33⁺CD14⁻CD11b⁺HLA-DR⁻ de los pacientes con CCC vs. sujetos indeterminados aunque la misma cantidad de células la expresan.
6. La expresión del IFN- γ total incrementó en los pacientes con CCC y la expresión del TNF- α disminuyó en la subpoblación CD3⁺CD4⁺ de los pacientes con CCC.
7. Se encontró un incremento en los niveles de Arginasa-1 en los pacientes con CCC al compararlos con los pacientes indeterminados y sujetos sanos
8. Los pacientes con enfermedad de Chagas en ambas fases de la enfermedad tuvieron una actividad de Arginasa elevada al compararla con los sujetos sanos.

9. La subpoblación CD33⁺CD14⁻CD11b⁺HLA-DR⁻iNOS⁺ mostró una correlación negativa con la disminución de las células CD3⁺CD8⁺.

X. REFERENCIAS.

1. Dumonteil E. Update on Chagas' disease in Mexico. *Salud Publica Mex.* 1999.
2. Pinto -Dias J, e Rodriguez-Coura, J. . *Clínica e terapéutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral.* FIOCRUZ. 1997.
3. Salud OMdl. Reporte sobre la enfermedad de Chagas: UNICEF/PNUD/Banco Mundial/OMS. 2007.
4. Franco-Paredes C, Bottazzi ME, Hotez PJ. The unfinished public health agenda of chagas disease in the era of globalization. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009.
5. Brys L, Beschin A, Raes G, Ghassabeh GH, Noel W, Brandt J, et al. Reactive oxygen species and 12/15-lipoxygenase contribute to the antiproliferative capacity of alternatively activated myeloid cells elicited during helminth infection. *J Immunol.* 2005 .
6. Gomez-Garcia L, Lopez-Marin LM, Saavedra R, Reyes JL, Rodriguez-Sosa M, Terrazas LI. Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells. *Parasite Immunol.* 2005.
7. Terrazas LI, Walsh KL, Piskorska D, McGuire E, Harn DA, Jr. The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1(+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. *J Immunol.* 2001.
8. Organization WH. Control of Chagas' disease - Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical report series 811 Geneva. 1991.
9. Cruz-Reyes A, Pickering-Lopez JM. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006.

10. Salud OPdl. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas: Organización Mundial de la Salud / Organización Panamericana de la Salud (OMS/OPS)2005.
11. Lent H WP. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. Bull Amer Mus Nat Hist. 1979.
12. Vidal-Acosta V I-BS, Martinez-Campos. Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. Salud Publica Mex. 2002.
13. Zarate LG ZR. Checklist of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of Mexico. Inter J Epidemiol. 1985.
14. de Meis J, Morrot A, Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DM, Savino W. Differential regional immune response in Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis. 2009.
15. Organization WH. Neglected tropical diseases. WHO; 2011 [cited 2011 01/01/2011]; Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/index.html.
16. Schmunis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. Transfusion. 1991.
17. Wendel S, Brener, Z., Camargo, ME., et al,. Chagas' disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT BRAZIL. 1992.
18. Schofield CJ, Dias JC. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. Adv Parasitol. 1999.
19. Salazar P MnR, Bucio M, Cabrera M, Romero M, Rojas G, Terán X, Guevara Y, Ruiz A, González L, Infante L. Manual para el Diagnósticode la Infección por *Trypanosoma cruzi*. Secretaria de Salud México; 2006.

20. Haro I S-SP, Cabrera M. . Diagnóstico Morfológico de las Parasitosis. 2ª ed 1995.
21. Sánchez-Guillen. High prevalence anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies, among blood donors in the estate of Puebla, a non-endemic area of México. Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. 2002.
22. Cura E WS. Manual de Procedimientos de Control de Calidad para los Laboratorios de Serología de los Bancos de Sangre. Washington D.C. U.S.A.: Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional: Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional; 1994.
23. Chaben INdCDMF. "Enfermedad de Chagas y otras Parasitosis. Manual de Laboratorio. 8ª ed. Buenos Aires, Argentina. 1996.
24. Guhl F NS. Manual de Procedimientos para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Bogotá Colombia: Ministerio de Salud; 2001.
25. Salud OPdl. Curso de capacitación médica en el diagnóstico, manejo y tratamiento de la enfermedad de Chagas. PAHO; 2004 [cited 2010 27/01/2010]; Available from: <http://www.paho.org/common/Display.asp?Lang=S&RecID=7882>.
26. En: Rosas F VDyCME. Enfermedad de Chagas. Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Vascul. Sociedad Española de Cardiología; 2007.
27. Francisco Jesús Merino Fernández MRMR, Isabel Camaño, Gutiérrez MF. Documento de consenso de recomendaciones para el control de la infección por *Trypanosoma cruzi* / Enfermedad de Chagas en gestantes Latinoamericanas . In: Madrid GdTdCdICAd, editor.: Comunidad Autónoma de Madrid; 2008.
28. Sartori AM, Ibrahim KY, Nunes Westphalen EV, Braz LM, Oliveira OC, Jr., Gakiya E, et al. Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. Ann Trop Med Parasitol. 2007.

29. Girones N, Cuervo H, Fresno M. Trypanosoma cruzi-induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005.
30. Henriques-Pons A, Oliveira GM, Paiva MM, Correa AF, Batista MM, Bisaggio RC, et al. Evidence for a perforin-mediated mechanism controlling cardiac inflammation in Trypanosoma cruzi infection. *Int J Exp Pathol*. 2002.
31. Koberle F. [Pathology and pathological anatomy of Chagas' disease]. *Bol Oficina Sanit Panam*. 1961.
32. Koberle F. The causation and importance of nervous lesions in American trypanosomiasis. *Bull World Health Organ*. 1970.
33. Davila DF, Donis JH, Torres A, Gottberg CF, Rossell O. Cardiac parasympathetic innervation in Chagas' heart disease. *Med Hypotheses*. 1991.
34. Davila DF, Rossell O, de Bellabarba GA. Pathogenesis of chronic chagas heart disease: parasite persistence and autoimmune responses versus cardiac remodelling and neurohormonal activation. *Int J Parasitol*. 2002 .
35. Rossi MA, Ramos SG. Coronary microvascular abnormalities in Chagas' disease. *Am Heart J*. 1996 .
36. Koberle F, Nador E. [Not Available]. *Rev Paul Med*. 1955 .
37. Petkova SB, Huang H, Factor SM, Pestell RG, Bouzahzah B, Jelicks LA, et al. The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. *Int J Parasitol*. 2001.
38. Morris SA, Wittner M, Weiss L, Hatcher VB, Tanowitz HB, Bilezikian JP, et al. Extracellular matrix derived from Trypanosoma cruzi infected endothelial cells directs phenotypic expression. *J Cell Physiol*. 1990.
39. Ehl S, Hombach J, Aichele P, Hengartner H, Zinkernagel RM. Bystander activation of cytotoxic T cells: studies on the mechanism and evaluation of in vivo significance in a transgenic mouse model. *J Exp Med*. 1997 .

40. Bangs SC, Baban D, Cattan HJ, Li CK, McMichael AJ, Xu XN. Human CD4+ memory T cells are preferential targets for bystander activation and apoptosis. *J Immunol.* 2009 .
41. Bangs SC, McMichael AJ, Xu XN. Bystander T cell activation--implications for HIV infection and other diseases. *Trends Immunol.* 2006.
42. McCoy L, Tsunoda I, Fujinami RS. Multiple sclerosis and virus induced immune responses: autoimmunity can be primed by molecular mimicry and augmented by bystander activation. *Autoimmunity.* 2006.
43. Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev.* 2006.
44. dos Santos PV, Roffe E, Santiago HC, Torres RA, Marino AP, Paiva CN, et al. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in Trypanosoma cruzi-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect.* 2001.
45. Marino AP, Azevedo MI, Lannes-Vieira J. Differential expression of adhesion molecules shaping the T-cell subset prevalence during the early phase of autoimmune and Trypanosoma cruzi-elicited myocarditis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003.
46. Marino AP, Silva AA, Pinho RT, Lannes-Vieira J. Trypanosoma cruzi infection: a continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix and adhesion and chemoattractant molecules. *Braz J Med Biol Res.* 2003.
47. Fernandez MA, Munoz-Fernandez MA, Fresno M. Involvement of beta 1 integrins in the binding and entry of Trypanosoma cruzi into human macrophages. *Eur J Immunol.* 1993.

48. Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res.* 2003.
49. Benvenuti LA, Higuchi ML, Reis MM. Upregulation of adhesion molecules and class I HLA in the myocardium of chronic chagasic cardiomyopathy and heart allograft rejection, but not in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol.* 2000.
50. Robinson TF, Cohen-Gould L, Factor SM. Skeletal framework of mammalian heart muscle. Arrangement of inter- and pericellular connective tissue structures. *Lab Invest.* 1983.
51. Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI. Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res.* 1988.
52. Cunha-Neto E, Rizzo LV, Albuquerque F, Abel L, Guilherme L, Bocchi E, et al. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res.* 1998.
53. Aiello VD, Reis MM, Benvenuti LA, Higuchi Mde L, Ramires JA, Halperin JA. A possible role for complement in the pathogenesis of chronic chagasic cardiomyopathy. *J Pathol.* 2002.
54. Metzger M HM, Brito T. Lack of apoptosis of cardiomyocytes in chronic chagasic myocarditis. *Virchow's Arch* 2001.
55. Rossi MA, Souza AC. Is apoptosis a mechanism of cell death of cardiomyocytes in chronic chagasic myocarditis? *Int J Cardiol.* 1999.
56. Burleigh BA, Andrews NW. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Microbiol.* 1998.
57. Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev.* 1992.

58. Grajal HC. L-arginine metabolism in experimental Chagas disease: role of arginase I and iNOS in heart tissue [Tesis de Doctorado]. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2008.
59. Buscaglia CA, Campo VA, Frasch AC, Di Noia JM. Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2006.
60. Frasch AC. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in Trypanosoma cruzi. *Parasitol Today.* 2000.
61. Tribulatti MV, Mucci J, Van Rooijen N, Leguizamon MS, Campetella O. The trans-sialidase from Trypanosoma cruzi induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. *Infect Immun.* 2005.
62. Mucci J, Hidalgo A, Mocetti E, Argibay PF, Leguizamon MS, Campetella O. Thymocyte depletion in Trypanosoma cruzi infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002.
63. Todeschini AR, Nunes MP, Pires RS, Lopes MF, Previato JO, Mendonca-Previato L, et al. Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal trans-sialidase: involvement of CD43 signaling. *J Immunol.* 2002.
64. Chuenkova MV, Pereira MA. A trypanosomal protein synergizes with the cytokines ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor to prevent apoptosis of neuronal cells. *Mol Biol Cell.* 2000.
65. Chuenkova M, Pereira ME. Trypanosoma cruzi trans-sialidase: enhancement of virulence in a murine model of Chagas' disease. *J Exp Med.* 1995.
66. Norris KA. Stable transfection of Trypanosoma cruzi epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. *Infect Immun.* 1998.

67. Previato JO, Andrade AF, Pessolani MC, Mendonca-Previato L. Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Mol Biochem Parasitol*. 1985.
68. Pereira-Chioccola VL, Acosta-Serrano A, Correia de Almeida I, Ferguson MA, Souto-Padron T, Rodrigues MM, 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.
69. Goni O, Alcaide P, Fresno M. Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells. *Int Immunol*. 2002.
70. Cunningham DS, Grogl M, Kuhn RE. Suppression of antibody responses in humans infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 1980.
71. Higuchi Mde L, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, et al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1993.
72. Reis DD, Jones EM, Tostes S, Jr., Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg*. 1993.
73. Higuchi MD, Ries MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS, Bellotti G, et al. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg*. 1997.
74. Reed SG, Inverso JA, Roters SB. Suppressed antibody responses to sheep erythrocytes in mice with chronic *Trypanosoma cruzi* infections are restored with interleukin 2. *J Immunol*. 1984.

75. Reis MM, Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, et al. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997.
76. Spinella S, Milon G, Hontebeyrie-Joskowicz M. A CD4+ TH2 cell line isolated from mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* induces IgG2 polyclonal response in vivo. *Eur J Immunol.* 1990.
77. Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol.* 2001.
78. Holscher C, Mohrs M, Dai WJ, Kohler G, Ryffel B, Schaub GA, et al. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun.* 2000.
79. Laucella SA, Segura EL, Riarte A, Sosa ES. Soluble platelet selectin (sP-selectin) and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) decrease during therapy with benznidazole in children with indeterminate form of Chagas' disease. *Clin Exp Immunol.* 1999.
80. Reis DD, Jones EM, Tostes S, Lopes ER, Chapadeiro E, Gazzinelli G, et al. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1993.
81. Dutra WO, Rocha MO, Teixeira MM. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol.* 2005.
82. Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun.* 1996.

83. Abrahamsohn IA, Coffman RL. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol*. 1996.
84. Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett*. 1992.
85. Hunter CA, Ellis-Neyes LA, Slifer T, Kanaly S, Grunig G, Fort M, et al. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with Trypanosoma cruzi. *J Immunol*. 1997.
86. Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to Trypanosoma cruzi infection. *J Immunol*. 1994.
87. Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. Regulation of Trypanosoma cruzi infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med*. 1991.
88. Abrahamsohn IA, da Silva AP, Coffman RL. Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to Trypanosoma cruzi. *Infect Immun*. 2000.
89. Golden JM, Tarleton RL. Trypanosoma cruzi: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Exp Parasitol*. 1991.
90. Wirth JJ, Kierszenbaum F, Zlotnik A. Effects of IL-4 on macrophage functions: increased uptake and killing of a protozoan parasite (Trypanosoma cruzi). *Immunology*. 1989.
91. Antunez MI, Cardoni RL. Early IFN-gamma production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental Trypanosoma cruzi infections. *Immunol Lett*. 2001.
92. Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*. 2000.

93. Fichera LE, Albareda MC, Laucella SA, Postan M. Intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in cardiac myocytes is inhibited by cytokine-induced nitric oxide release. *Infect Immun*. 2004.
94. Minoprio P, Andrade L, Lembezat MP, Ozaki LS, Coutinho A. Indiscriminate representation of VH-gene families in the murine B lymphocyte responses to *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 1989.
95. Lenzi HL, Oliveira DN, Lima MT, Gattass CR. *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. *Exp Parasitol*. 1996.
96. Nogueira N, Cohn Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J Exp Med*. 1976.
97. McCabe RE, Remington JS, Araujo FG. Mechanisms of invasion and replication of the intracellular stage in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 1984.
98. Kumar S, Tarleton RL. The relative contribution of antibody production and CD8⁺ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol*. 1998.
99. Martin D, Tarleton R. Generation, specificity, and function of CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Rev*. 2004.
100. Powell MR, Morgan J, Guarner J, Colley DG. Cytokine mRNA levels in the hearts of inbred mice that develop different degrees of cardiomyopathy during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol*. 1998.
101. Zhang L, Tarleton RL. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp Parasitol*. 1996.

102. Zhang L, Tarleton RL. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *Eur J Immunol*. 1996.
103. Espinoza B, Rico T, Sosa S, Oaxaca E, Vizcaino-Castillo A, Caballero ML, et al. Mexican *Trypanosoma cruzi* T. cruzi I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *J Biomed Biotechnol*. 2010.
104. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol*. 2002.
105. Machado FS, Koyama NS, Carregaro V, Ferreira BR, Milanezi CM, Teixeira MM, et al. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis*. 2005.
106. Hardison JL, Wrightsman RA, Carpenter PM, Kuziel WA, Lane TE, Manning JE. The CC chemokine receptor 5 is important in control of parasite replication and acute cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2006.
107. Hardison JL, Wrightsman RA, Carpenter PM, Lane TE, Manning JE. The chemokines CXCL9 and CXCL10 promote a protective immune response but do not contribute to cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2006.
108. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009.
109. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol*. 2007.
110. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008.

111. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 2008.
112. Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, Zamboni P, et al. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood*. 2000.
113. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *J Leukoc Biol*. 2003.
114. Li Q, Pan PY, Gu P, Xu D, Chen SH. Role of immature myeloid Gr-1+ cells in the development of antitumor immunity. *Cancer Res*. 2004.
115. Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI. Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol*. 2004.
116. Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol*. 2001.
117. Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007.
118. Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res*. 2001.
119. Dietlin TA, Hofman FM, Lund BT, Gilmore W, Stohlman SA, van der Veen RC. Mycobacteria-induced Gr-1+ subsets from distinct myeloid lineages have opposite effects on T cell expansion. *J Leukoc Biol*. 2007.
120. Zhu B, Bando Y, Xiao S, Yang K, Anderson AC, Kuchroo VK, et al. CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2007.

121. Greten TF, Manns MP, Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *Int Immunopharmacol*. 2011.
122. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2009.
123. Giordanengo L, Guinazu N, Stempin C, Fretes R, Cerban F, Gea S. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. *Eur J Immunol*. 2002.
124. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Colombo MP, et al. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest*. 2006.
125. Pan PY, Wang GX, Yin B, Ozao J, Ku T, Divino CM, et al. Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood*. 2008.
126. Nefedova Y, Nagaraj S, Rosenbauer A, Muro-Cacho C, Sebti SM, Gabrilovich DI. Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res*. 2005.
127. Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang S, Pilon-Thomas S, et al. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med*. 2005.
128. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol*. 2007.

129. Cheng P, Corzo CA, Luetteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med*. 2008.
130. Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*. 2008.
131. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM, et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med*. 2007.
132. Kusmartsev SA, Li Y, Chen SH. Gr-1+ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. *J Immunol*. 2000.
133. Watanabe S, Deguchi K, Zheng R, Tamai H, Wang LX, Cohen PA, et al. Tumor-induced CD11b+Gr-1+ myeloid cells suppress T cell sensitization in tumor-draining lymph nodes. *J Immunol*. 2008.
134. Movahedi K, Guillems M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*. 2008.
135. Haile LA, von Wasielowski R, Gamrekashvili J, Kruger C, Bachmann O, Westendorf AM, et al. Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology*. 2008.
136. Kusmartsev S, Nagaraj S, Gabrilovich DI. Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol*. 2005.
137. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med*. 2007.

138. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol*. 2005.
139. Gobert AP, Bambou JC, Werts C, Balloy V, Chignard M, Moran AP, et al. *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 mediates interleukin-6 production by macrophages via a toll-like receptor (TLR)-2-, TLR-4-, and myeloid differentiation factor 88-independent mechanism. *J Biol Chem*. 2004 Jan 2;279(1):245-50.
140. Bronte V, Serafini P, Mazzoni A, Segal DM, Zanovello P. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol*. 2003.
141. Bronte V, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Tosello V, Mazzoni A, et al. IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 2003.
142. Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res*. 2004.
143. Zhang M, Caragine T, Wang H, Cohen PS, Botchkina G, Soda K, et al. Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J Exp Med*. 1997.
144. Pericle F, Pinto LA, Hicks S, Kirken RA, Sconocchia G, Rusnak J, et al. HIV-1 infection induces a selective reduction in STAT5 protein expression. *J Immunol*. 1998.
145. Pericle F, Kirken RA, Bronte V, Sconocchia G, DaSilva L, Segal DM. Immunocompromised tumor-bearing mice show a selective loss of STAT5a/b expression in T and B lymphocytes. *J Immunol*. 1997.
146. Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol*. 1999.

147. Fligger J, Blum J, Jungi TW. Induction of intracellular arginase activity does not diminish the capacity of macrophages to produce nitric oxide in vitro. *Immunobiology*. 1999.
148. El-Gayar S, Thuring-Nahler H, Pfeilschifter J, Rollinghoff M, Bogdan C. Translational control of inducible nitric oxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages. *J Immunol*. 2003.
149. Otsuji M, Kimura Y, Aoe T, Okamoto Y, Saito T. Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996.
150. Youn JI, Gabrilovich DI. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol*. 2010.
151. Van Ginderachter JA, Beschin A, De Baetselier P, Raes G. Myeloid-derived suppressor cells in parasitic infections. *Eur J Immunol*. 2010.
152. Cuervo H, Guerrero NA, Carbajosa S, Beschin A, De Baetselier P, Girones N, et al. Myeloid-derived suppressor cells infiltrate the heart in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2011.
153. Cuervo H, Pineda MA, Aoki MP, Gea S, Fresno M, Girones N. Inducible nitric oxide synthase and arginase expression in heart tissue during acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice: arginase I is expressed in infiltrating CD68+ macrophages. *J Infect Dis*. 2008.
154. Voisin MB, Buzoni-Gatel D, Bout D, Velge-Roussel F. Both expansion of regulatory GR1+ CD11b+ myeloid cells and anergy of T lymphocytes participate in hyporesponsiveness of the lung-associated immune system during acute toxoplasmosis. *Infect Immun*. 2004.

155. Mencacci A, Montagnoli C, Bacci A, Cenci E, Pitzurra L, Spreca A, et al. CD80+Gr-1+ myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis. *J Immunol.* 2002.
156. Laucella SA, Postan M, Martin D, Hubby Fralish B, Albareda MC, Alvarez MG, et al. Frequency of interferon- gamma -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis.* 2004.
157. Leavey JK, Tarleton RL. Cutting edge: dysfunctional CD8+ T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2003.