



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis Cuantitativo de la Expresión de las  
Quimiocinas CCL2 y CCL12, y su Receptor CCR2, en  
Tejido Cardíaco de ratones infectados con una Cepa  
Mexicana de *Trypanosoma cruzi*.

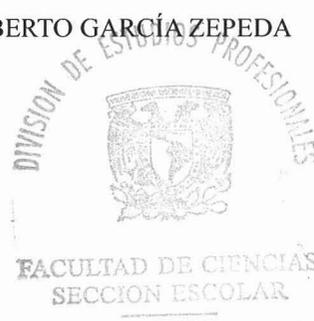
T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I Ó L O G A  
P R E S E N T A :  
ANA ELBA ROJAS LÓPEZ



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

DIRECTOR DE TESIS DR. EDUARDO ALBERTO GARCÍA ZEPEDA

2005



0350268



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo reespecial.

NOMBRE: Rojas López Ana Elba

FECHA: 22 de Noviembre de 2005

FIRMA: [Signature]

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ.**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias.**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: Análisis Cuantitativo de la Expresión de las Quimiocinas CCL2 y CCL12, y su Receptor CCR2, en Tejido Cardíaco de ratones infectados con una Cepa Mexicana de *Trypanosoma cruzi*.

realizado por Ana Elba Rojas López

con número de cuenta 09713688-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de:

Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director  
Propietario

Dr. Eduardo Alberto García Zepeda [Signature]

Propietario

Dr. Pedro Ulises Ostoa Saloma [Signature]

Propietario

Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes [Signature]

Suplente

Dra. María Antonieta Aladro Lubel [Signature]

Suplente

Dr. Guillermo Salgado Maldonado [Signature]

Consejo Departamental de  
Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. [Signature]  
Juan Manuel Rodríguez Chávez



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

**Esta Tesis se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en el Laboratorio de Investigación de la Biología de las Quimiocinas bajo la dirección del Dr. Eduardo García Zepeda.**

## DEDICATORIAS.

A mis padres Mario Rojas y Candelaria López por su apoyo incondicional y su inmenso amor.

A mi gran familia que siempre ha animado a seguir adelante.

A todos mis queridos amigos que hicieron de la licenciatura una experiencia increíble.

A Luis por hacer estos años de mi vida los más felices y maravillosos.

-

## AGRADECIMIENTOS.

A mi tutor el Dr. Eduardo García por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Selma, Itzel, Anita, Yahaira, Silvana, Ileana, Nancy y Paco por su amistad y la disposición de enseñarme y ayudarme.

A Marcela Ramírez Yarza, quien me brindó su amistad, su tiempo y su paciencia, y quien me enseñó todas las técnicas necesarias para realizar este trabajo.

## CONTENIDO.

	Página
<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>ANTECEDENTES</b>	2
<b>Características de las Quimiocinas</b>	2
• Clasificación	2
▪ Quimiocinas CXC	2
▪ Quimiocinas CC	3
▪ Quimiocinas C y CX3C	3
• Receptores de Quimiocinas	7
• Quimiocinas de la Familia MCP	8
○ CCL2/MCP-1	9
○ CCL12/MCP-5	10
○ CCR2	11
• CCR5	13
• Participación de las Quimiocinas en la Respuesta Inmune	14
<b>Enfermedad de Chagas</b>	19
• Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
• Enfermedad de Chagas en México	19
• Clasificación de las cepas de <i>T. cruzi</i>	20
• Patología de la Enfermedad de Chagas	20
• Invasión de la célula hospedera por el tripomastigote	21
<b>Respuesta Inmune ante <i>T. cruzi</i></b>	22
• Tipos celulares infiltrantes al tejido cardiaco durante la infección	22
• Citocinas y Enfermedad de Chagas	23
• Respuesta Humoral	24
• Quimiocinas en la Enfermedad de Chagas	25
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	28
<b>HIPÓTESIS</b>	28
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	29
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	29
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	29
<b>RESULTADOS</b>	35
• Parasitemia y supervivencia	35
• Características físicas de los ratones infectados	35
• Expresión de quimiocinas en tejido cardiaco	36
• Análisis por RT-PCR semicuantitativo	36
• Análisis por PCR en tiempo real	37
• Expresión de CCR2	37

• Expresión de CCL2/MCP-1	37
• Expresión de CCL12/MCP-5	37
• Expresión de CCR5	38
• Expresión de fractalcina y su receptor	38
<b>DISCUSIÓN</b>	46
<b>CONCLUSIÓN</b>	55
<b>LITERATURA CITADA</b>	56

## INDICE DE FIGURAS.

	Página.
<b>ANTECEDENTES.</b>	
Tabla 1. Familia de Quimiocinas y sus Receptores	5
Tabla 2. Clasificación funcional de las Quimiocinas	6
Figura 1. Modelo tridimensional de la estructura de los receptores de quimiocinas CXCR4 y CCR5.	7
Tabla 3. Quimiocinas importantes en la infección por bacterias y hongos	17
Tabla 4. Quimiocinas importantes en la infección por helmintos y protozoarios	18
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	
Tabla 5. Mezcla de reacción para síntesis de ADNc	30
Tabla 6. Secuencia de los oligos de quimiocinas utilizadas en el análisis.	31
Tabla 7. Mezcla de reacción para PCR semicuantitativo.	32
Tabla 8. Mezcla de reacción para PCR en tiempo real.	33
<b>RESULTADOS.</b>	
Figura 2. Curva de Parasitemia y Supervivencia	39
Figura 3. Corte longitudinal de corazón de un ratón BaALB/c no inoculado con <i>T. cruzi</i>	40
Figura 4. Corte longitudinal de corazón de un ratón inoculado con <i>T. cruzi</i> . 15 días de infección.	40
Figura 5. Corte longitudinal de corazón de un ratón inoculado con <i>T. cruzi</i> . 30 días de infección.	40
Figura 6. ARN total obtenido de tejido cardíaco. Diferentes tiempos de infección.	41
Figura 7. Productos de amplificación por PCR semicuantitativo de los genes DHFR, CCR2, CCL2/MCP-1, CCL12/MCP-5, y CCR5 a partir de tejido cardíaco.	41
Figura 8. Análisis densitométrico de la expresión de quimiocinas y sus receptores en el tejido cardíaco.	42
Figura 9. Análisis por PCR tiempo real de la expresión de CCR2 en tejido cardíaco de ratones infectados.	43
Figura 10. Análisis por PCR tiempo real de la expresión de CCL2/MCP-1 en tejido cardíaco de ratones infectados.	43
Figura 11. Análisis por PCR tiempo real de la expresión de CCL12/MCP-5 en tejido cardíaco de ratones infectados.	44
Figura 12. Análisis por PCR tiempo real de la expresión de CCR5 en tejido cardíaco de ratones infectados	44
Figura 13. Análisis por PCR tiempo real de la expresión de CX3CL1/Fractalcina y CX3CR1 en tejido cardíaco de ratones infectados	45.

## RESUMEN.

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, es un padecimiento de alta prevalencia y morbilidad en América Latina. Los pacientes con Chagas presentan cardiomegalia, entre otros signos, durante la fase aguda de la enfermedad, mientras que la miocarditis chagásica es la principal patología en la fase crónica.

Se ha demostrado que la expresión de quimiocinas y sus receptores, es determinante para la resolución de la parasitemia sanguínea y en el tejido durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas, y también se ha propuesto que estas proteínas son factores importantes en el desarrollo de la miocarditis crónica.

En este trabajo se analizó la expresión de las quimiocinas CCL2/MCP-1 y CCL12/MCP-5, y su receptor CCR2, así como CCR5, CX3CR1 y CX3CL1/Fractalcina en tejido cardiaco de ratones infectados con la cepa Querétaro de *T. cruzi* mediante RT PCR en tiempo real, para inferir la participación de estas quimiocinas durante la fase aguda en un modelo murino, y comparar nuestros resultados con los reportados, con respecto de estas quimiocinas, para la cepas suramericanas de *T. cruzi*, cuya patogenicidad pudiese ser diferente.

Los resultados mostraron un incremento significativo en la expresión del receptor CCR2, CCR5 y la quimiocina CCL12/MCP-5 en el tejido cardiaco de los ratones infectados a partir del día 5 con respecto de tejido control, mientras que los niveles de expresión de CCL2/MCP-1 aumentaron significativamente desde las 5 horas. A diferencia del resto de los genes analizados, CCR2 mostró una expresión máxima hacia el día 15 de infección, la cual se redujo hacia el término de la infección experimental. El aumento en la expresión de quimiocinas tuvo una correlación directa con un mayor número de parásitos en sangre.

Los datos obtenidos indican que hay un aumento en la expresión de CX3CL1/Fractalcina y su receptor en el tejido cardiaco que parece estar asociado a la infección. Sin embargo este aumento no fue diferente al valor registrado para la condición control.

El incremento progresivo de la expresión de CCL2/MCP-1 y CCL12/MCP-5, y la disminución en la expresión de receptor CCR2 a partir del día 20 de infección en tejido cardiaco en el modelo murino, puede relacionarse con la contribución de estas quimiocinas en el montaje y la regulación de la respuesta tipo Th2, aumentando la susceptibilidad a la infección aguda en este modelo experimental. Así mismo, una mayor migración de células que expresan el receptor CCR5 y no CCR2, pudiesen favorecer una respuesta Th2.

## **INTRODUCCIÓN.**

### **ANTECEDENTES.**

#### **Características de las Quimiocinas.**

Las quimiocinas, son proteínas de bajo peso molecular (8-12 kDa), que participan en la regulación de la migración y activación de leucocitos durante el montaje de la respuesta inmune (Moser et al, 2004). Estas moléculas se han identificado en todos los grupos de vertebrados, e incluso en los microorganismos, principalmente en los virus, donde se ha comprobado que juegan un papel muy importante en los mecanismos de invasión celular y evasión de la respuesta inmune. Hasta el momento, se han identificado 46 quimiocinas en los mamíferos, de las cuales 40 se han reportado en el humano (Laing et al, 2004).

#### **Clasificación.**

A diferencia de otras citocinas, las quimiocinas se caracterizan por presentar un motivo tetra-cisteína en el extremo amino terminal. La posición relativa de las dos primeras cisteínas es el criterio fundamental con el cual se clasifican estas moléculas en cuatro subfamilias principales: CC, CXC, CX<sub>3</sub>C y XC, donde la X simboliza un aminoácido que separa a las cisteínas (Tabla 1) (Rot y von Andrian, 2004; Moser et al, 2004; Laing et al, 2004).

#### **Quimiocinas CXC.**

Las quimiocinas CXC, codificadas en su mayoría en el cromosoma 4q21.1 se dividen en dos grupos dependiendo de la presencia de la secuencia de aminoácidos ácido glutámico-leucina-arginina (ELR) entre el extremo amino terminal y la primera cisteína.

Las quimiocinas con ELR son potentes atractores de neutrófilos. CXCL8/IL-8 se considera la quimiocina tipo de este grupo y tiene funciones de quimiotaxis de neutrófilos, monocitos y linfocitos T, actividad angiogénica, y promueve la liberación de histamina por los basófilos. Este tipo de quimiocinas interacciona con los receptores CXCR1 y CXCR2 (Brenier –Pinchart et al., 2001; Rot y von Andrian, 2004; Jonson 2004).

En comparación con las quimiocinas ELR+, las quimiocinas que no tienen esta secuencia de aminoácidos (ELR-), atraen débilmente a los neutrófilos. En cambio promueven la quimiotaxis de fibroblastos, linfocitos T, linfocitos infiltradores de tumores (TIL) y

progenitores hematopoyéticos, y regulan procesos de angiogénesis . Algunos ejemplos de estas quimiocinas son CXCL4/PF4, CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10 que interaccionan con el receptor CXCR3, y CXCL2 que es el ligando del receptor CXCR4 (Brenier –Pinchart et al., 2001; Rot y von Andrian, 2004; Jonson 2004).

Las principales células productoras de quimiocinas CXC son los macrófagos, los monocitos, las células NK, los granulocitos y los linfocitos T, así como las células del estroma de la médula ósea y el timo, las plaquetas, las células epiteliales, los fibroblastos, las células endoteliales y los keratinocitos.

### **Quimiocinas CC**

Las quimiocinas de la familia CC están codificadas principalmente en el cromosoma 17q, en las regiones 11.2 y 12. Dentro de la agrupación 17q11.2, se pueden distinguir dos familias génicas: la familia de la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP) y la familia de proteínas quimotácticas de monocitos (MCP). Estas quimiocinas tienen un amplio espectro de acción dado que activan a los monocitos, los linfocitos T, las células NK, los eosinófilos, los basófilos y las células dendríticas.

Entre sus múltiples funciones se ha reportado que las quimiocinas CC participan en la angiogénesis y la neovascularización, en resistencia al virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, coestimulan a las células T e incrementan la histólisis mediada por células NK ( Van Coillie et al., 1999).

### **Quimiocinas C y CX3C**

El grupo de las quimiocinas C está representado por la XCL1 anteriormente llamada linfotactina, y por XCL2. Estas quimiocinas están codificadas en el cromosoma 1q24.2, y promueven la migración de los linfocitos. Interaccionan con el receptor XCR1 (Brenier – Pinchart et al., 2001; Rot y von Andrian, 2004; Jonson 2004)..

Por otra parte la CX3CL1/Fractalcina interviene en la migración de linfocitos citotóxicos al endotelio, en la comunicación entre neuronas y células de la microglia y es un factor que promueve la supervivencia neuronal. Está codificada en el cromosoma 16q13 (Brenier –Pinchart et al., 2001; Rot y von Andrian, 2004; Jonson 2004).

Su receptor, CX3CR1, es expresado por las células endoteliales, las células de microglía, los macrófagos (Raport et al., 1995), las células dendríticas de la lámina propia intestinal (Niess et al., 2005) y las células NK (Imai et al., 1997).

En modelos animales se ha demostrado que fractalcina, producida por las células endoteliales y las células musculares de los vasos sanguíneos, es importante para el reclutamiento de los macrófagos en las placas arterioscleróticas, participando activamente en la formación de lesiones y oclusión de la pared de los vasos (Lesnik et al., 2003).

Desde el punto de vista funcional, algunos autores agrupan a la quimiocinas en homeostáticas e inflamatorias (Tabla 2). Las quimiocinas homeostáticas se producen de manera constitutiva y son importantes para la formación del tejido linfoide, para la movilización de precursores hematopoyéticos dentro de la médula ósea y el timo, permiten que los eventos de presentación de antígeno ocurran, y mantienen el “patrullaje” de tejido sano. Por su parte las quimiocinas inflamatorias, son inducidas por el contacto entre células de un tejido y diversos patógenos, y estimuladas por el microambiente de citocinas producidas por los macrófagos y las células dendríticas residentes que procesan al antígeno de dicho patógeno. También son las encargadas de que las células activadas, tanto de la inmunidad innata como adaptativa, lleguen al tejido afectado y realicen sus funciones efectoras. Se ha identificado, sin embargo, un tercer grupo de quimiocinas a las que se les denomina duales, dado que son sobreexpresadas durante el proceso inflamatorio, y también tienen como blanco a las células progenitoras (Moser et al, 2004).

Tabla 1. Familia de Quimiocinas y sus Receptores (Modificado de Richmond, 2002).

CXC				
Nombre	Cromosoma humano	Ligando humano	Ligando murino	Receptor
CXCL1	4q12-q13	GRO $\alpha$ /MGS $\alpha$	GRO/KC?	CXCR2 > CXCR1
CXCL2	4q12-q13	GRO $\beta$ /MGS $\beta$	GRO/KC?	CXCR2
CXCL3	4q12-q13	GRO $\gamma$ /MGS $\gamma$	GRO/KC?	CXCR2
CXCL4	4q12-q13	PF4	PF4	Desconocido
CXCL5	4q12-q13	ENA-78	LIX?	CXCR2
CXCL6	4q12-q13	GCP-2	CK $\alpha$ -3	CXCR1, CXCR2
CXCL7	4q12-q13	NAP-2	Desconocido	CXCR2
CXCL8	4q12-q13	IL-8	Desconocido	CXCR1, CXCR2
CXCL9	4q21.21	Mig	Mig	CXCR3
CXCL10	4q21.21	IP-10	IP-10	CXCR3
CXCL11	4q21.21	I-TAC	Unknown	CXCR3
CXCL12	10q11.1	SDF-1 $\alpha/\beta$	SDF-1	CXCR4
CXCL13	4q21	BLC/BCA-1	BLC/BCA-1	CXCR5
CXCL14	Desconocido	BRAK/bolekine	BRAK	Desconocido
(CXCL15)	Desconocido	Desconocido	Lungkine	Desconocido
C				
Nombre	Cromosoma humano	Ligando humano	Ligando murino	Receptor
XCL1	1q23	Lymphotactin/SCM-1 $\alpha$ /ATAC	Lymphotactin	XCRI
XCL2	1q23	SCM-1 $\beta$	Desconocido	XCRI
CX <sub>3</sub> C				
Nombre	Cromosoma humano	Ligando humano	Ligando murino	Receptor
CX3CL1	16q13	Fractalkine	Neurotactin	CX3CR1
CC				
Nombre	Cromosoma humano	Ligando humano	Ligando murino	Receptor
CCL1	17q11.2	I-309	TCA-3, P500	CCR8
CCL2	17q11.2	MCP-1/MCAF	JE?	CCR2
CCL3	17q11.2	MIP-1 $\alpha$ /LD78 $\alpha$	MIP-1 $\alpha$	CCR1, CCR5
CCL4	17q11.2	MIP-1 $\beta$	MIP-1 $\beta$	CCR5
CCL5	17q11.2	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
(CCL6)	Desconocido	Desconocido	C10, MRP-1	Desconocido
CCL7	17q11.2	MCP-3	MARC?	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	17 $\alpha$ 11.2	MCP-2	MCP-2?	CCR3
(CCL9/10)	Desconocido	Desconocido	MRP-2, CCF18 MIP-1 $\gamma$	Desconocido
CCL11	17q11.2	Eotaxin	Eotaxin	CCR3
(CCL12)	Desconocido	Desconocido	MCP-5	CCR2
CCL13	17q11.2	MCP-4	Desconocido	CCR2, CCR3
CCL14	17q11.2	HCC-1	Desconocido	CCR1
CCL15	17q11.2	HCC-2/Lin-1/MIP-15	Desconocido	CCR1, CCR3
CCL16	17q11.2	HCC-4/LEC	LCC-1	CCR1
CCL17	16q13	TARC	TARC	CCR4
CCL18	17q11.2	DC-CK1/PARC AMAC-1	Desconocido	Desconocido
CCL19	9p13	MIP-3 $\beta$ /ELC/exodus-3	MIP-3 $\beta$ /ELC/exodus-3	CCR7
CCL20	2q33-q37	MIP-3 $\alpha$ /LARC/exodus-1	MIP-3 $\alpha$ /LARC/exodus-1	CCR6
CCL21	9p13	6CKine/SLC/exodus-2	6CKine/SLC/exodus-2/TCA-4	CCR7
CCL22	16q13	MDC/STCP-1	ABCD-1	CCR4
CCL23	17q11.2	MPIF-1	Desconocido	CCR1
CCL24	7q11.23	MPIF-2/Eotaxin-2	Desconocido	CCR3
CCL25	19p13.2	TECK	TECK	CCR9
CCL26	7q11.23	Eotaxin-3	Desconocido	CCR3
CCL27	9p13	CTACK/ILC	ALP/CTACK/ILC ESKine	CCR10*

Tabla 2. Clasificación Funcional de las Quimiocinas (Moser et al 2004)

Inflammatory			Homeostatic			Dual-Function			
CXCL6 <sup>a,b</sup> (GCP-2) <sup>c</sup>	CXCR1 <sup>d</sup>	Innate immunity (Granulocytes)	CXCL12 (SDF-1)	CXCR4	Hematopoiesis	CXCL9 (Mig)	CXCR3	T lymphopoiesis	
CXCL8 (IL-8)			CXCL13 (BCA-1)	CXCR5	Follicular activities	CXCL10 (IP-10)		Adaptive immunity (Th1 responses)	
CXCL1 (GRO $\alpha$ )	CXCR2		CXCL14 (BRAK)	ND	B-cell responses	CXCL11 (I-TAC)		Adaptive immunity (Cutaneous T cells)	
CXCL2 (GRO $\beta$ )			CXCL19 (ELC)	CCR7	APC development	CCL17 (TARC)	CCR4	T lymphopoiesis	
CXCL3 (GRO $\gamma$ )			CCL21 (SLC)			CCL22 (MDC)		Adaptive immunity (Cutaneous T cells)	
CXCL5 (ENA-78)			CCL18 (DC-CK1)	n.d.		CCL20 (LARC)	CCR6	DC development Adaptive immunity	
CXCL6 (GCP-2)	CXCR1	Extravasation (Inflammation)	CCL19 (ELC)	CCR7	T lymphopoiesis	CCL1 (I-309)	CCR8	T lymphopoiesis Adaptive immunity	
CXCL7 (NAP-2)			CCL21 (SLC)		Spleen-, LN-homing (T-cell area)			Th2 or Th responses	
CXCL8 (IL-8)			CCL18 (DC-CK1)	n.d.	T-cell-DC interaction (Spleen, LN)				
CX3CL1 (Fractalkine)									
CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )	CCR1	Innate and adaptive immunity				CCL25 (TECK)	CCR9	T lymphopoiesis	
CCL5 (RANTES)									Adaptive immunity T and B cell traffic in small intestine
CCL7 (MCP-3)									
CCL8 (MCP-2)	CCR2								
CCL13 (MCP-4)									
CCL14 (HCC-1)									
CCL15 (HCC-2)									
CCL2 (MCP-1)	CCR3								
CCL7 (MCP-3)									
CCL8 (MCP-2)									
CCL13 (MCP-4)									
CCL5 (RANTES)	CCR5								
CCL7 (MCP-3)									
CCL8 (MCP-2)									
CCL11 (Eotaxin)									
CCL13 (MCP-4)	CCR10								
CCL15 (HCC-2)									
CCL24 (Eotaxin-2)									
CCL26 (Eotaxin-3)									
CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )	CCR5								
CCL4 (MIP-1 $\beta$ )									
CCL5 (RANTES)									
CCL8 (MCP-2)									
XCL1, XCL2	XCR1								
Lymphotactin- $\alpha,\beta$									
CCL27 (CTACK)	CCR10								
CCL28 (MEC)	CCR3								
	CCR10								

## Receptores de las Quimiocinas

Para ejercer estas funciones, las quimiocinas señalizan a través de receptores de siete dominios transmembranales (7TMS) asociados a proteínas  $G_i$  heterotriméricas (Fig.1). Un receptor puede unir a varias moléculas de quimiocina y una quimiocina se puede unir a varios receptores. Esta plasticidad ocurre únicamente dentro de las familias y, de cierta forma, está restringida por la especificidad hacia el ligando, que se ha propuesto reside en la región amino terminal, tanto de la quimiocina como del receptor. La especificidad está definida por la eficiencia de señalización, es decir, la magnitud de la respuesta inducida por el ligando y la habilidad de encender varias rutas de señalización y regulación en la célula blanco (Rot y von Andrian, 2003).

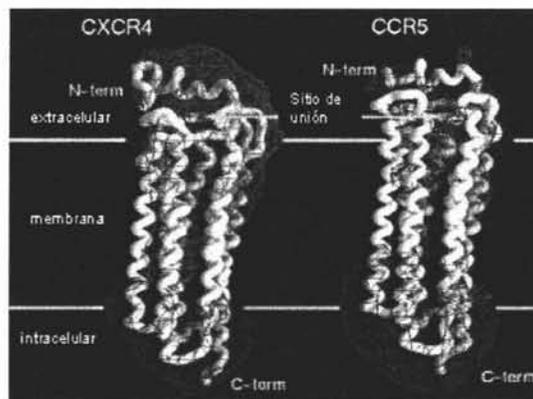


Figura 1. Modelo tridimensional de la estructura de los receptores de quimiocinas CXCR4 y CCR5. Modificado de Broder y Collman, 1997.

Al unirse al receptor, la quimiocina induce un cambio en la conformación terciaria del mismo, permitiendo que las asas intracelulares interaccionen con la subunidad  $\alpha$  de las proteínas  $G_i$ . Una vez activadas, las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  estimulan a la fosfolipasa  $C\beta$  (PLC $\beta$ ), a las cinasa de fosfoinosítido 3 (PI3K), factores que regulan la liberación de calcio intracelular, y por lo tanto la polimerización de la actina y la migración, y a la familia de cinasas de tirocina c-Src, que activan a los factores de transcripción como NF $\kappa$ -B, permitiendo la expresión de otras citocinas y quimiocinas ( Rot y von Andrian, 2004; Moser et al, 2004).

La señalización de receptores de quimiocinas está regulada principalmente por la fosforilación de residuos de serina en el extremo carboxilo del receptor, y la internalización de los receptores de quimiocinas en vesículas de clatrina. Una vez internalizados, los receptores pueden ser degradados o reciclarse en la membrana. El proceso de reciclamiento de

receptores, permite que la célula sense los gradientes de quimiocina continuamente, lo cual le permite responder de manera rápida a los estímulos inflamatorios en un tejido afectado ( Rot y von Andrian, 2004; Moser et al, 2004).

El Receptor DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines), expresado principalmente por células endoteliales postcapilares, no pertenece a la familia en la que se agrupa los receptores de quimiocinas, sin embargo se ha demostrado que tiene alta afinidad por miembros de los grupos CXC ELR y CC. Se ha propuesto que estos receptores funcionan como reservorio de quimiocinas, controlando la concentración en circulación de estas moléculas ( Rot y von Andrian, 2003)

### **Quimiocinas de la Familia MCP.**

Las quimiocinas MCP dadas sus características estructurales y funcionales son consideradas una subfamilia de las quimiocinas CC. En el humano este subgrupo incluye a CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2 y CCL13/MCP-4 (Van Coillie et al., 1999).

Dada su similitud estructural y funcional, y a que se encuentra codificada en el mismo grupo de genes, la quimiocina CCL11/Eotaxina también se incluye dentro de la familia MCP (García-Zepeda et al., 1996).

En el ratón se han identificado análogos de la quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL7 y CCL11, y se caracterizó a la quimiocina CCL12/MCP-5, miembro único codificado en el cromosoma 11. CCL12/MCP-5 muestra homología funcional con la quimiocina CCL2/MCP-1 humana, y homología en su secuencia con la quimiocina CCL13 (Sarafi et al., 1997).

La similitud en la secuencia de aminoácidos de las MCP humanas y la eotaxina es de 56-71%, mientras que la similitud interespecífica es de un 49-64% (Van Coillie et al., 1999).

Las quimiocinas MCP son producidas por diferentes tipos celulares, incluyendo células de tejido endotelial y epitelial, las células de músculo liso, los keratinocitos, los fibroblastos, los osteoblastos, los astrocitos y la microglía, así como los leucocitos y las células tumorales. Los principales inductores de la secreción de estas quimiocinas son IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ . Otras citocinas como IL-4, INF $\alpha/\beta$ , el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y el factor de crecimiento tumoral (TGF)- $\beta$ , y productos exógenos como mitógenos, ARN de doble cadena, virus y lipopolisacárido (LPS) también aumentan la expresión de las MCP (Van Coillie et al., 1999).

## CCL2/MCP-1

CCL2/MCP-1 es la quimiocina MCP mas estudiada, dado que es la principal atrayente de monocitos durante el montaje de la respuesta inmune celular. Inicialmente esta quimiocina fue aislada a partir de líneas celulares tumorales que la producen en altos niveles de manera constitutiva. Posteriormente, estudios de estimulación de células *in vitro*, demostraron que múltiples tipos celulares expresan CCL2/MCP-1, y que las fuentes principales de esta quimiocina son las células endoteliales, fibroblastos y células mononucleares (Van Coillie et al., 1999).

Por ensayos de migración, se ha reportado que CCL2/MCP-1 es un potente atrayente de células mononucleares, basófilos y linfocitos T; también es capaz de inducir quimiotaxis de células NK que ha sido preestimuladas con IL-2. En estos tipos celulares, la estimulación de CCL2/MCP-1 también desemboca en otros procesos. Los monocitos secretan enzimas que degradan matriz extracelular, expresan más integrinas en membrana, y secretan radicales libres de oxígeno, mientras que los basófilos liberan histamina y leucotrienos. En el caso de las células NK y los linfocitos T citotóxicos, CCL2/MCP-1 induce la liberación de sus gránulos potenciando sus funciones citotóxicas (Van Coillie et al., 1999).

Se han realizado múltiples modelos murinos de sobreexpresión de CCL2/MCP-1 regulada por diferentes promotores de proteínas de órganos específicos. Como resultado, se ha observado un incremento en el infiltrado mononuclear a dichos órganos. Por otro lado, un modelo de sobreexpresión (Rutledge et al., 1995) donde la quimiocina esta bajo el control del promotor MMTV-LTR del virus de tumor mamario, muestra altos niveles de quimiocina en suero y en varios órganos; sin embargo, no se observa un infiltrado de monocitos en los órganos productores de CCL2/MCP-1. Estos ratones también son mas sensibles a infecciones por *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium tuberculosis* que se ha propuesto, está relacionada con una desensibilización del receptor CCR2 en las células circulantes hacia los sitios de producción específica de CCL2/MCP-1. Por lo tanto una deficiencia en la respuesta Th1, pudiese ser importante para la resolución de estas infecciones (Van Coillie et al., 1999; Daly and Rollins 2003).

De manera contraria, los ratones deficientes en CCL2/MCP-1, son incapaces de reclutar macrófagos en peritoneo al ser estimulados con tioglicolato. En el contexto de infección por *Schistosoma mansoni*, la deficiencia de CCL2/MCP-1 está directamente relacionada con una reducción del 40% en el tamaño de los granulomas pulmonares y en la reducción de los niveles de IL-4 e IL-5. Por otro lado en los ratones que carecen de CCL2/MCP-1 se observa resistencia ante la infección por *M. tuberculosis* (Lu et al, 1998).

### **CCL12/MCP-5.**

Esta quimiocina se encuentra en el cromosoma 11 dentro de la región de genes CC en el ratón. Fue identificada a partir del análisis de una librería genómica de ratón usando como prueba una secuencia de ADNc de CCL13 humana. La secuencia de CCL12/MCP-5 es un 66% idéntica a la de CCL2/MCP-1 humana, a comparación de CCL2/MCP-1 murina que solo es un 55% idéntica (Sarafí et al., 1997).

CCL12/MCP-5 es un potente atractor de monocitos periféricos. Se expresa constitutivamente en colon, riñón, pulmón, corazón, nódulos linfáticos, glándulas mamarias y salivales, y es secretada por macrófagos estimulados con INF- $\gamma$  y LPS (Sarafí et al., 1997).

El análisis de la expresión de CCL2/MCP-1 y CCL12/MCP-5 en modelos murinos de arteriosclerosis (Luntgens et al., 2005) e inflamación pulmonar (Qiu et al., 2001) muestra un papel sinérgico de estas quimiocinas en cuanto a la atracción de macrófagos al tejido afectado. Sin embargo, estas quimiocinas muestran papeles opuestos en cuanto a la polarización de la respuesta adaptativa hacia tipo Th1 o Th2, como se demostró en modelos de inflamación glandular en ratón (Blease et al., 2001; Akpek et al., 2004). En estos modelos CCL2/MCP-1 induce una respuesta de tipo Th2, mientras que CCL12/MCP-5 está involucrada en la polarización hacia Th1.

En un modelo de arteriosclerosis en ratones ApoE deficientes, se observó la expresión de las quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL12/MCP-5, CCL3, CCL4 y CX3CL1/Fractalcina. Estas moléculas son expresadas principalmente por macrófagos en la placa arteriosclerótica. A partir de ensayos de ELISA se determinó que CCL2/MCP-1 y CCL12/MCP-5 se secretan en proporciones similares en tejido (Lutgens et al., 2005)

La formación de granulomas pulmonares en ratones por antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* y *Schistosoma mansoni*, induce la expresión de diferentes quimiocinas en diferentes fases de la infección. Durante los primeros dos días después de la inoculación de

antígenos, las principales quimiocinas que se expresan son CCL2/MCP-1, CCL12/MCP-5, CCL3 y CCL4, que regulan la migración de macrófagos, y por lo tanto favorecen la formación del granuloma (Qiu et al., 2001).

Por otra parte, la inducción de alergia pulmonar en ratones CBA/J por inoculación de conidios de *Aspergillus fumigatus*, induce la expresión de altos niveles de CCL2/MCP-1, no así de CCL12/MCP-5 o CCL7. el bloqueo de las funciones de CCL2/MCP-1 mediante un anticuerpo, muestran que esta quimiocina es importante tanto para eliminar los conidios, como en el proceso de hipersensibilidad, eosinofilia, secreción de IL-4 y desarrollo de fibrosis peribronqueal (Blease et al., 2001)

También se ha reportado que el desarrollo de síndromes inflamatorios en glándulas lagrimales y salivales está asociada a una respuesta Th2. En el modelo murino de estos fenómenos inflamatorios, por inmunohistoquímica se detectó alta expresión de CCL2/MCP-1 en el tejido de dichas glándulas. En el caso de CCL12/MCP-5, esta quimiocina fue detectada en los cortes analizados en bajos niveles (Akpek et al., 2004)

## **CCR2**

CCR2 fue identificado como el receptor de CCL2/MCP-1, CCL7 y CCL13 a partir de ensayos de transfección de este receptor en líneas celulares (Murdoch y Finn, 2000). La estimulación por citocinas proinflamatorias induce la expresión de este receptor en monocitos, linfocitos T y B, basófilos, eosinófilos, células endoteliales, fibroblastos, y células de músculo estriado y músculo liso (Murdoch y Finn, 2000).

Se han identificado dos isoformas (A y B) del receptor CCR2 en líneas celulares humanas. Estas isoformas son producto de un mismo gen en el cromosoma 3p21 y varían en la secuencia de su extremo carboxilo (Murdoch y Finn, 2000).

El gen de CCR2 está conformado por tres exones; el exón 1 codifica para el extremo 5' de ambos receptores, el exón 2 codifica para el marco de lectura y el extremo 3' de CCR2 B, y el transcrito del exón tres contiene el extremo carboxilo de CCR2 A. Si durante la transcripción del gen se reconoce la señal de poliadenilación al término del exón 2, el mRNA sintetizado corresponderá a CCR2 B; si la señal no se reconoce la transcripción continuará a lo largo del exón 3. El pre mRNA resultante tendrá las secuencias del extremo carboxilo de ambas isoformas; la edición de este pre-mRNA determinará que isoforma será expresada (Bartoli et al., 2001).

Ensayos en diferentes líneas celulares, demostraron que la isoforma que se expresa mayoritariamente es CCR2B. La baja expresión de la isoforma A probablemente esté relacionada con su retención en el citoplasma mediada por residuos aminoácidos del extremo carboxilo (Bartoli et al 2001).

Existe una estrecha relación en la secuencia de CCR2, CCR1 y CCR5, dado que están codificados de forma contigua en el mismo cromosoma. CCR2 B tiene una similitud del 56% con la secuencia de CCR1, mientras que presenta un porcentaje de homología con el extremo carboxilo de CCR1 del 36%. Por su parte la secuencia de CCR5 es idéntica a la de CCR2 en un 71%. El gen de CCR5 está codificado tan solo 18 Kb de distancia del gen de CCR2, lo cual sugiere que ambos receptores tienen un gen ancestral común (Bartoli et al., 2001).

En el ratón sólo se ha identificado una isoforma del receptor CCR2, el cual interacciona con CCL2/MCP-1 murina y CCL12/MCP-5. CCL2/MCP-1 muestra mayor avidéz por el receptor comparada con CCL12/MCP-5, sin embargo, dado a su similitud con CCL2/MCP-1 humana, CCL12/MCP-5 es capaz de interactuar con CCR2 humano más eficientemente que CCL2/MCP-1 murino (Sarafí et al, 1997).

Se ha reportado que en modelos murinos de inflamación, las principales células que migran que expresan CCR2 son monocitos/macrófagos (Mack et al., 2001)

La función *in vivo* de CCR2 se ha estudiado en modelos de disrupción del gen del receptor.

La deficiencia de CCR2 no tiene efecto en el crecimiento, desarrollo y fertilidad de los ratones modificados y no interviene en la acumulación constitutiva de macrófagos peritoneales; sin embargo, no se observa reclutamiento de macrófagos en el peritoneo de ratones inoculados con tioglicolato (Kuziel et al, 1997; Kurihara, 1997). El reclutamiento reducido de células mononucleares también se ve reflejado en la reducción en el tamaño de los granulomas hepáticos por inyección de glucanos, y granulomas pulmonares por inoculación de *Mycobacterium bovis* (Kuziel et al, 1997; Boring et al, 1997).

Por otra parte, los ratones que no expresan CCR2, son susceptibles a la infección por *Listeria monocytogenes* (Kurihara T, 1997), *C. elegans*, *Leishmania donovani* y *L. major* (Sato et al, 2000, Peters et al 2000). En particular, el desarrollo de la leishmaniasis en el ratón

modificado (C57BL/6), es comparable con el fenotipo del ratón susceptible (BALB/c) infectado con el mismo parásito (Sato et al, 2000).

La susceptibilidad del ratón deficiente en CCR2 está relacionada con la reducción en la migración de células dendríticas CD8 $\alpha^+$ , estimuladoras de respuesta Th1, hacia los nódulos linfáticos y el bazo, reduciendo la coestimulación y presentación de antígeno a los linfocitos T, su capacidad de producir INF- $\gamma$ , y estimulando la proliferación de linfocitos B, que además de producir anticuerpos, son fuentes de IL-4 (Boring et al, 1997; Sato et al, 2000; Peters et al 2000; Cheaussebel et al., 2003)

### **CCR5.**

A pesar de que tiene una alta identidad con la secuencia de CCR2, el receptor CCR5, no interacciona con quimiocinas clasificadas dentro del grupo MCP. Este receptor está codificado en el cromosoma 3p21 (Liu et al., 1996) y es expresado por los granulocitos (Samson et al., 1996), los monocitos/macrófagos y los linfocitos T activados, así como en las neuronas, los astrocitos, la microglia, las células endoteliales, epiteliales, musculares de los vasos sanguíneos y los fibroblastos (Rottman et al., 1997). Por transfección de este receptor en una línea celular de ovario de hamster, se determinó que su principal ligando es CCL3/MIP-1 $\alpha$ , interaccionando también con CCL4/MIP-1 $\beta$  y CCL5/RANTES en concentraciones fisiológicas (Samson et al., 1996).

Se ha demostrado que en condiciones inflamatorias crónicas, hay un aumento en el número de células que expresan el receptor CCR5 en el tejido afectado (Rottman et al., 1997). Así mismo, en modelos murinos se ha evidenciado la participación de este receptor en el tráfico leucocitario al cerebro en enfermedades virales, fungicas, y por *Plasmodium bergeri*, causante de la malaria cerebral (Belnoue et al., 2003).

De manera importante, tanto en modelos animales (murino y chimpance), como en pacientes, CCR5 junto con el receptor CXCR4 y la molécula CD4, es correceptor de la proteína Gp120 del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) participando en la entrada del virus a los linfocitos T CD4 $^+$  y monocitos. Al respecto se ha realizado un trabajo de investigación muy extenso.

## **Participación de las Quimiocinas en la respuesta inmune**

Como se mencionó anteriormente, los microorganismos inducen la producción de quimiocinas al estimular directamente a las células dendríticas y a los macrófagos residentes, así como a la célula del parénquima y el estroma del tejido infectado. Dicha estimulación es resultado de la interacción de antígeno con receptores de patrones moleculares (PRR) como los receptores tipo Toll (TLR). Moléculas propias del organismo, como el fibrinógeno, la elastasa y las defensinas también pueden interactuar con los PRR e inducir la expresión de quimiocinas. Sin embargo, la regulación primordial de la expresión de quimiocinas está dada por citocinas proinflamatorias, tales como interleucina (IL)-1, factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , interferon (INF)- $\gamma$ , y citocinas inmunomoduladoras como IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IL-17 (Rot y Von Andrian, 2004).

La cantidad y composición de citocinas y quimiocinas que se generan durante la respuesta ante un patógeno, determinan el tipo de respuesta inmune innata del organismo infectado. Se han categorizado dos tipos de respuesta. La respuesta tipo 1 esta relacionada con la expresión de ligandos de CCR1, CCR5, CXCR3 y CXCR6. La producción de estas quimiocinas es directamente inducida por la señalización de TLR y por IL-1, IL-2, IL-12, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Por otro lado, la respuesta tipo 2 se asocia a quimiocinas que interactúan con los receptores CCR3, CCR4 y CCR8 (Rot y Von Andrian, 2004).

El perfil de quimiocinas, así como los niveles de citocinas inmunomoduladoras, son determinantes para la polarización de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, hacia Th1 o Th2, definiendo así el tipo de respuesta adaptativa que resolverá la infección. Las células Th1 producen citocinas proinflamatorias, que potenciarán la respuesta celular contra los patógenos intracelulares. La respuesta Th2 está guiada por la expresión de citocinas inmunomoduladoras y estimula principalmente la inmunidad humoral, protegiendo al organismo de infecciones en el tracto respiratorio y digestivo, así como en reacciones alérgicas en estos sitios (Rot y Von Andrian, 2004).

Se ha demostrado que durante la estimulación de células T “naive” con antígeno, CCL3 induce una polarización celular hacia Th1, mientras que CCL2/MCP-1 diferencia a las células hacia Th2 (Rot y Von Andrian, 2004).

El análisis de leucocitos aislados de cordón umbilical, y diferenciados hacia Th1 o Th2, por estimulación con IL-12 o IL-4 respectivamente, permitió identificar los receptores de quimiocinas que expresan mayoritariamente cada una de las clonas. Las células Th1 responden principalmente a los ligandos de los receptores CCR2, CCR5 y CXCR3, mientras que los linfocitos Th2 expresan CCR3 y CCR4. En el caso de los receptores CCR1 y CXCR4, no se observó diferencia en la expresión entre los dos linajes, aunque la expresión de CCR1 respecto de la CXCR4 es mucho menor (Bonecci R et al, 1998). Cabe mencionar que CXCR4 es uno de los receptores que se expresa en todos los leucocitos, tanto maduros, como inmaduros (Moser et al., 2004).

La expresión diferencial de citocinas y quimiocinas por linfocitos Th1 y Th2 también se ha estudiado en modelos murinos en los que se observa, de manera definida, cada una de las respuestas; los ratones C57BL/6J tienen respuestas Th1 típicas, mientras que los BALB/cJ muestran un perfil Th2 (Bonecci et al., 1998; Charles et al., 1999).

Los C57BL/6J producen primordialmente INF- $\gamma$ , citocina base para la estimulación y mantenimiento de la respuesta Th1, y CXCL10, quimiocina que atrae primordialmente células NK y linfocitos Th1 (Charles et al., 1999).

En el caso de los ratones BALB/cJ, estos expresan bajos niveles de INF- $\gamma$ , permitiendo que citocinas como IL-4 e IL-10 actúen promoviendo la diferenciación de los linfocitos CD4<sup>+</sup> hacia Th2. Por otro lado, expresan altos niveles de linfotoxina (LT)- $\beta$ , que regula la migración de células dendríticas al bazo y potenciando una respuesta humoral fuerte, y INF- $\beta$  que induce la disminución en la proliferación de linfocitos, la producción de TNF- $\alpha$  y linfotoxina, y reduce la expresión de moléculas coestimuladoras y de adhesión, así como de la sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS), enzima fundamental en el estallido respiratorio. La INF- $\beta$  también induce un aumento en los niveles de CXCL10 (Charles et al 1999).

En cuanto a los receptores de quimiocinas, la cepa BALB/cJ presenta niveles más elevados de ARN mensajero para receptores de quimiocinas que los C57BL/6J, principalmente el de los receptores CCR3 y CXCR4 (Charles et al., 1999).

### **Quimiocinas y enfermedades infecciosas.**

En casi todas las enfermedades provocadas por microorganismos que se han estudiado, las quimiocinas juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria del huésped, ya sea confiriendo resistencia al individuo, o bien contribuyendo al establecimiento y proliferación del agente infeccioso (Chensue et al., 2001).

En el caso de las enfermedades causadas por virus, se ha propuesto que las quimiocinas participan reclutando a células citotóxicas y células productoras de INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  que eventualmente destruirán a las células infectadas. Sin embargo es muy poco lo que se sabe acerca de la función de las quimiocinas como factores que confieren resistencia a la infección viral (Chensue et al., 2001).

En las tablas 3 y 4 se resume la participación de diferentes quimiocinas en enfermedades provocadas por bacterias, hongos, helmintos y protozoarios.

Tabla 3. Quimiocinas importantes ante la infección por bacterias y hongos. Basada en Chensue et al., 2001

Organismo	Quimiocinas	Función
<b>Bacterias</b>		
<i>Bacillus subtilis</i>	Variantes truncados de quimiocinas CXC	Dirigen la respuesta bactericida
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Lactococcus lactis</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	CXC ELR <sup>+</sup>	Amplifican la señal reclutadora de neutrófilos iniciada por productos liberados por la bacteria
<i>Pseudomonas aureaginosa</i>		
<i>Shigella flexneri</i>	CXCL-8	Esencial en la prevención de la invasión. Por otra parte promueve el daño tisular por neutrófilos activados.
<i>Mycoplasma sp</i>	CXCL-1, CXCL-8, CCL-2, CCL-3, CCL-4	Respuesta primaria a la infección
<i>Borrelia burgdorferi</i>	CXCL-1, CXCL-8, CCL-3, CCL-5	Promueven el daño tisular y la artritis crónica
<i>Propionibacterium acnes</i>	CCL-17	Recluta células CD4 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup> en el hígado, provocando falla hepática letal.
<i>Mycobacteria spp.</i>	CCL-2, CCL-5, CXCL-8	CCL-2 promueve la migración de macrófagos, células clave para la colonización de ésta bacteria.
<i>Listeria spp.</i>	CXCL2, CXCL-8, CXCL-10, CCL2/MCP-1, CCL-3, CCL-5	Contribuyen a la eliminación del microorganismo.
<b>Hongos</b>		
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CXC	Promueven la eliminación del hongo
	CCL-3	Recluta fagocitos en los pulmones e interviene en la resistencia del sistema nervioso a la infección.
	CCL1	Confiere resistencia vía CCL-2 y CCL-3
<i>Candida sp.</i>	CCL-3, CCL-4, CCL-5	Resistencia al hongo
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CXC ELR <sup>+</sup>	Resistencia a la infección
	CCR2, CCR1	Desarrollo de neumonitis por hipersensibilidad y fibrosis pulmonar.

Tabla 4. Quimiocinas importantes en la infección con helmintos y protozoarios. Basado en Chensue et al., 2001 y Brenier-Pinchart 2001.

Organismo	Quimiocinas	Función
<b>Helmintos</b>		
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	CCR3	Promueve las respuestas Th2. Media la migración de eosinófilos.
<i>Onchocera volvulus</i>	CXCL-8, CCL-5, CCL11	Destrucción del parásito
<i>Schistosoma mansoni</i>	CCL-5	Inhibe la producción de IL-4 por células Th2
<b>Protozoarios</b>		
<i>Plasmodium knowlesi</i> <i>Plasmodium vivax</i>	Receptor DARC	Actúa como receptor de este parásito en eritrocitos y células endoteliales
	CXCL-8, CXCL1	Inhiben la unión del parásito al receptor DARC
<i>Plasmodium falciparum</i>	CXCL-8, CCL-3	No se ha establecido su función
<i>Leishmania major</i>	CCI-2, CXCL-8	Reclutamiento de macrófagos a las zonas de lesión cutánea y acción antimicrobiana
<i>Leishmania donovani</i>	CCL-2, CCL-3 y CXCL10	Median la inflamación hepática y la formulación de granulomas que confiere resistencia contra la enfermedad en ratones inmunocompetentes.
<i>Leishmania mexicana</i>	CCL-2, CCL-3	Expresadas mayoritariamente en la lesiones cutáneas causadas por esta especie
<i>Toxoplasma gondii</i>	CXCL-9, CXCL-10	Relacionados con el cambio de tipos celulares inflamatorios en el peritoneo de ratones susceptibles, a lo largo de la enfermedad.
<i>Trypanosoma cruzi</i>	CCL-3, CCL-4 y CCL-5	Resistencia a la infección y destrucción del parásito vía NO en macrófagos
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	CCL-2, CCL-3 y CCL-5	Promueven la invasión y daño del sistema nervioso central
<i>Entamoeba histolytica</i> <i>Cryptosporidium parvum</i>	CXCL-8 y CXCL1	Reclutamiento de linfocitos polimorfonucleares en el colon durante la fase aguda de infección.
<i>Trichomonas vaginalis</i>	CXCL-8	Mantenimiento de un infiltrado local de neutrófilos. Resistencia a la enfermedad.

## **Enfermedad de Chagas.**

Chagas es una de las enfermedades parasitarias más importantes de América Latina por las alteraciones cardíacas, entéricas y neurológicas que produce. Se calcula que hasta el momento, 18 millones de personas infectadas y alrededor del 25% de la población se encuentra en riesgo de contraer la infección (Guzman- Bracho, 2001).

### **Ciclo de Vida de *Trypanosoma cruzi*.**

El agente causante de la enfermedad de Chagas' es *Trypanosoma cruzi*, parásito intracelular hemoflagelado que puede infectar cualquier célula nucleada. Durante el ciclo de vida *T. cruzi* presenta diferentes estadios de desarrollo y diferentes hospederos. El primer estadio, epimastigote, se reproduce asexualmente y se transforma en tripomastigote a lo largo del tracto digestivo de un hemíptero perteneciente a los géneros *Traitoma*, *Rhodinus* o *Panstrongylus*. Mediante el depósito de heces fecales en la zona de picadura del insecto, o el contacto de estas con la conjuntiva ocular, los tripomastigotes acceden a las células del segundo hospedero, cualquier mamífero incluyendo al hombre. Dentro de la célula el tripomastigote se aloja y divide en una vacuola parasitófora, dando origen al tercer estadio, amastigote, el cual rompe la célula y es capaz de infectar otras, o bien puede diferenciarse en tripomastigote y entrar a la circulación sanguínea (Monteon 1996, Guzmán-Bracho 2001).

### **Enfermedad de Chagas en México**

En México existen 23 especies de insectos triatóminos. La mayoría de estas especies han sido encontradas con infección natural por *T. cruzi*, sin embargo, las principales especies transmisoras en nuestro país son *Triatoma barberi*, que se distribuye en la región central del territorio nacional abarcando 14 estados, *Triatoma dimidiata*, cuya distribución se extiende tanto en la costa del Golfo como en la del Pacífico, abarcando la Península de Yucatán; las especies del complejo *Phylosoma*, que se distribuyen también en la costa del Pacífico, y en el Norte del país, en los estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas. En San Luis Potosí, se encuentra la especie *Triatoma gerstaeckeri*.

A partir de la detección del primer caso de la enfermedad hasta el año 2000, se han confirmado más de 400 casos de enfermedad de Chagas en fase aguda en los 23 estados al sur del Trópico de Cáncer. En áreas suburbanas y rurales de esta región la seroprevalencia de anticuerpos contra *T. cruzi* abarcó al 20% de la población analizada mayor de 5 años. Por otra parte, un estudio nacional entre los años 1987 y 1989, reveló que el 1.6% de los 70 000

individuos analizados, presenta anticuerpos contra el parásito, siendo la región central de la Huasteca, la zona con mayor prevalencia. A partir de estos datos, una aproximación basada en el censo realizado en el año 2000, indica que de un total de 97.4 millones de personas, 1.6 millones pudiesen estar infectados por *T. cruzi* (Guzman- Bracho, 2001).

### **Clasificación de las cepas de *T. cruzi*.**

Reportes sobre la biología, infectividad, genética y resistencia a drogas, han definido a *T. cruzi* como un organismo muy heterogeneo. Dicha heterogeneidad pudiese tener implicaciones epidemiológicas, en el sentido de que diferentes cepas pudiesen inducir diferentes síntomas clínicos (Espinoza et al., 1998).

La caracterización de las cepas de *T. cruzi* se ha basado en criterios biológicos (biodemas) (Devera et al., 2003), de análisis de isoenzimas (zimodemas) y análisis de polimorfismos en segmentos restringidos de el ADN del cinetoplasto (schizodemas) (Macedo et al., 2004). Estos análisis no han sido concluyentes en cuanto a la generación de un árbol taxonómico consenso. Estudios recientes utilizando ADN polimorfico amplificado al azar han permitido distinguir dos linajes principales (I y II) de *T. cruzi*, cada uno altamente heterogeneo (Macedo et al., 2004). En este mismo análisis, las cepas mexicanas del parásito pertenecen mayoritariamente al linaje I, mientras que las cepas sudamericanas son pertenecientes al linaje II (Bosseno et al., 2002).

### **Patología de la Enfermedad de Chagas.**

La infección por *T. cruzi* en el hospedero mamífero consta de tres fases: una fase aguda, una fase indeterminada y una fase crónica ( Soares et al., 1999; Aliberti et al., 2001; Michailowsky et al., 2001).

La fase aguda, tiene una duración de 2 a 4 meses en los humanos (Michailowsky et al., 2001) y se caracteriza por la presencia de parásitos en circulación sanguínea, así como una reacción inflamatoria en la zona de entrada del parásito y el desarrollo de miocarditis (Aliberti et al., 2001). La progresión de la fase aguda a la fase crónica de la enfermedad coincide con la desaparición de los tripomastigotes del torrente sanguíneo. Este periodo, conocido como fase indeterminada, no presenta sintomatología y puede durar hasta 20 años ( Soares et al., 1999).

La fase crónica típica afecta primordialmente el corazón y se presenta en aproximadamente el 25% de los casos. Se caracteriza por grados variables de hipertrofia y dilatación del corazón, y se observan focos de necrosis y degeneración del miocardio, fibrosis intersticial, y un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente de células mononucleares. De manera importante, pocas veces se observan miofibrillas con parásitos ( Soares et al., 1999).

La otra manifestación clínica predominante consiste en la dilatación megamórfica del esófago y el colon como resultado de la destrucción por el parásito de la innervación de estos órganos. Esta patología ocurre en menos del 10% de los casos ( Soares et al., 1999).

### **Invasión de la célula hospedera por el tripomastigote.**

La comunicación entre el tripomastigote y la célula hospedera dirige el proceso de invasión de tejidos por *T. cruzi*. En esta comunicación, los carbohidratos en la superficie del parásito y en la célula hospedera, tienen gran importancia. La familia de las transialidasas de *T. cruzi* permiten la interfase tripomastigote –célula al interactuar con residuos de ácido siálico y marcadores de superficie en macrófagos y linfocitos T.

También se han reportado moléculas de secreción del parásito que al interactuar con receptores en la célula hospedera promueven invasión de los tripomastigotes (Burleigh et al., 2002; Calvet et al., 2003, 2004).

Se ha reportado la liberación de moléculas agonistas de los receptores para TGF $\beta$  en células epiteliales, los cuales inducen la transcripción de genes como el inhibidor 1 del activador de plasminógeno (PAI-1) (Ming et al., 1995; Hall y Pereira, 2000).

La oligopeptidasa B, peptidasa de cisteína citosólica del tripomastigote corta un precursor inactivo de un factor agonista de calcio, que es liberado e interactúa con receptores de siete dominios transmembranales estimulando la liberación de calcio intracelular (Burleigh et al., 1997; Caler et al., 1998 y 2000).

Así mismo la cruzipaina, principal proteasa liberada por los tripomastigotes, promueve la entrada del parásito a la célula mediante el corte de quinínogeno y la producción de quininas, las cuales activarán al receptor de bradiquininas en la célula hospedera, induciendo también la liberación de calcio intracelular (Scharfstein et al., 2000)

Tc-85, glicoproteína de 85kDa, le permite al tripomastigote migrar a través de la matriz extracelular, mediante su unión específica a laminina y citoqueratina (Calvet et al., 2004).

Otros elementos de la matriz extracelular como el heparán sulfato y la fibronectina, también son importantes en la invasión de cardiomiocitos (Calvet et al., 2003, 2004)

La liberación de calcio intracelular inducida por el parásito, culmina en la activación de mecanismos fagocíticos y endocíticos en la célula blanco. Una vez dentro de la vacuola fagocítica, el tripomastigote libera inhibidores de hidrolasas y proteasas, constituyendo una vacuola parasitófora donde podrá diferenciarse al estadio de amastigote y replicarse (Burleigh et al., 2002; Garzoni et al., 2003).

### **Respuesta Inmune ante *T. cruzi*.**

#### **Tipos celulares infiltrantes al tejido cardíaco durante la infección por *T. cruzi***

Parte de la investigación acerca de la respuesta inmune ante la enfermedad de Chagas se ha orientado a la caracterización de los tipos celulares que infiltran los órganos infectados, principalmente el miocardio, así como las citocinas y quimiocinas que intervienen tanto en el control de la parasitemia como en el desarrollo de los síndromes crónicos (dos Santos et al., 2001, Marino et al 2003).

El análisis de leucocitos periféricos de pacientes con enfermedad de Chagas permitió distinguir la predominancia de diferentes poblaciones en diversas fases de la enfermedad. Durante la fase aguda temprana se registra una expansión policlonal de linfocitos B, un incremento en la expresión de ICAM-1 en monocitos, y la reducción en superficie de esta molécula de adhesión en linfocitos T. Durante la fase aguda tardía se observó un incremento de células NK inmaduras, y persistencia en la expansión de linfocitos B y reducción de ICAM-1 en los linfocitos T. De esta forma durante la fase aguda se propicia la migración, principalmente de monocitos, al tejido cardíaco y la producción de anticuerpos que en su mayoría no son inespecíficos contra los tripomastigotes (Montes et al., 2002)

En el caso de la fase crónica temprana de la enfermedad, se mantiene la disminución de moléculas de adhesión I-CAM en los linfocitos T, así como la expansión de linfocitos B del subtipo B1, mientras que en los monocitos se incremento la expresión de moléculas MHC II,

molécula que está involucrada en la promoción de respuestas citotóxicas por linfocitos T CD8+ (Sathler-Avelar et al., 2003).

Por otra parte, se sabe que en pacientes con enfermedad de Chagas crónica las principales células asociadas con la presencia de miocarditis son linfocitos T, con una predominancia de CD8+ (Reis et al., 1993; Higuchi Mde et al., 1993; Higuchi et al., 1997). Esta células presentan un fenotipo activado, expresando moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de tipo II (Moore-Lai et al., 2004).

De forma similar, se ha reportado que el infiltrado inflamatorio en los órganos de los ratones infectados con *T. cruzi*, durante la fase aguda, se caracteriza, mayoritariamente, por linfocitos CD4+ y CD8+ y macrófagos en un modelo de infección con la cepa Y de *T. cruzi* (Talvani et al., 2003). Dependiendo del modelo experimental (dos Santos et al., 2001, Marino et al 2003), la proporción de estos tipos celulares cambia hacia la fase crónica de la enfermedad, siendo mayoritarios los linfocitos T en el tejido cardiaco.

A partir de una caracterización de marcadores de superficie, se sabe que los linfocitos T periféricos, en bazo y en tejido cardiaco en ratones con infección crónica inducida por la cepa Colombiana III de *T. cruzi*, muestran un fenotipo activado caracterizado por un aumento en la expresión del antígeno asociado a la función de leucocitos (LFA)-1 y el antígeno de activación muy tardía (VLA)-4, así como una reducción en selectina L en la superficie celular. Dicho fenotipo se registra desde la fase aguda de la infección, hasta la fase crónica sintomática (dos Santos et al., 2001, Marino et al 2003).

### **Citocinas y Enfermedad de Chagas**

La resistencia y susceptibilidad ante la enfermedad de Chagas, así como la progresión hacia un síndrome crónico severo, depende en gran medida, de la citocinas y quimiocinas que secrete el infiltrado celular en los órganos infectados.

A partir de un análisis de microarreglos de ADNc humano, hibridizados con ADNc de fibroblastos infectados con *T. cruzi*, se registró expresión genica *de novo* a partir de las 24 horas postinfección (Vaena de Avalos et al., 2002; Murkherjee et al., 2003). Entre los genes más expresados se encuentran aquellos que son inducidos por INF(citocinas y quimiocinas tipo I), y se observa una correlación entre la expresión de estos factores y las secreción de INF- $\beta$  por los fibroblastos infectados (Vaena de Avalos et al., 2002; Murkherjee et al., 2003)

La interacción de los antígenos del parásito con receptores de la inmunidad innata como TLR2 y TLR4 en macrófagos y células dendríticas, tienen como resultado la activación de rutas de señalización que inducen la expresión de genes de citocinas y quimiocinas (Cohelo et al., 2002; Campos et al., 2004; Oliveira et al., 2004)

Se ha demostrado que los tripomastigotes activan la vía de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK) en las células del miocardio, al inducir la fosforilación de la cinasa de regulación de señales extracelulares (ERK) y como consecuencia la translocación al núcleo de los factores de transcripción AP-1 y NF- $\kappa$ B, induciendo también la expresión de citocinas y quimiocinas (Huang et al., 2003).

Durante la enfermedad de Chagas experimental, tanto en ratones resistentes como susceptibles a la infección muestran respuestas mixtas de citocinas Th1 y Th2.

Se ha propuesto que durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, la secreción de citocinas de tipo Th1, IL-12 y TNF- $\alpha$  por los macrófagos, e INF- $\gamma$  por las células NK y los linfocitos T principalmente, es importante en el control de la parasitemia y la resistencia a la enfermedad, mientras que altos niveles de IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ , citocinas Th2, contribuyen a la persistencia del parásito e incrementan la severidad de la enfermedad (Abrahamsohn et al., 1996; Tarleton et al., 2000; Müller et al., 2001; Hoft et al., 2002). De manera contraria, durante la fase crónica, la persistencia de niveles elevados de INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Abel et al., 2001), mantienen una respuesta inflamatoria exacerbada que resulta en daño al tejido cardíaco, siendo las citocinas Th2, importantes para la regulación de esta respuesta inflamatoria. (Gomes et al., 2003; Aliberti et al., 2001; Machado et al. 2000; Aliberti et al., 1996; DosReis, 1997; Cardillo et al. 1998; Gazinelli et al., 1998; Giordanengo et al., 2002; Michailowsky et al., 2001; Rodrigues et al., 2000; Villalata et al., 1998)

En los infiltrados celulares y en las células infectadas, también se ha detectado la presencia de IL-1 $\beta$ , citocina que recientemente se vinculó con el desarrollo de hipertrofia en los cardiomiocitos, a las 48 horas postinfección en un modelo experimental con la cepa Y de *T. cruzi*. (Petersen y Burleigh. 2003)

### **Respuesta Humoral**

Como se mencionó con anterioridad, como consecuencia de la infección con *T. cruzi*, se registra una expansión policlonal de linfocitos B, que secretan principalmente anticuerpos IgG. Aunque gran parte de estos anticuerpos no son específicos contra el parásito, se han

detectado tanto en el humano como en el ratón, anticuerpos de subtipo IgG1 e IgG2 que reconocen proteínas membranales del tripomastigote de 76 a 160 kDa (Umekita y Mota, 2000). Estos anticuerpos son necesarios para la lisis por complemento (Krautz et al., 2000). Los tripomastigotes son capaces de inhibir el sistema del complemento mediante la secreción de Calreticulina, molécula que se une al elemento C1q del complemento (Ferreira et al 2004).

Durante la fase crónica de la enfermedad, se ha reportado que los anticuerpos que reconocen antígenos del tripomastigote también reconocen moléculas del huésped como miosina, tubulina y laminina que son expuestas en las fibras cardíacas necróticas (Lopez ; Soares et al., 2001; Engman y Leon, 2002; Leon y Engman, 2003). En particular, se sabe que los anticuerpos contra proteína ribosomales del tripomastigote, se unen a receptores  $\beta$ -adrenérgicos y de acetilcolina induciendo defectos en la contracción del músculo cardíaco (Bustamante et al., 2003; Joensen et al., 2003; Cremashi et al., 2004).

### **Quimiocinas en la Enfermedad de Chagas.**

Las respuestas celulares iniciales ante la infección por *T. cruzi* dependen de la interacción de moléculas de superficie y de secreción del parásito con receptores tipo Toll (TLR) en la superficie de macrófagos y células dendríticas (Ropert et al., 2002; Campos et al., 2004). El receptor TLR2 reconoce a la familia de mucinas unidas a glicofosfatidilinositol de *T. cruzi* y a una proteína de secreción del tripomastigote denominada Tc52 (Ropert et al., 2002; Campos et al., 2004). La señalización de este receptor induce la producción de quimiocinas como CCL2/MCP-1, CCL3/MIP1- $\alpha$  importantes para la migración y activación de células mononucleares, y CXCL8/IL-8, esta última mediando el reclutamiento de neutrófilos a la región peritoneal y al miocardio (Cohelo et al., 2002)

También se ha reportado que los glicoinositolfosfolípidos (GIPL) de *T. cruzi* interaccionan con TLR4 e inducen la secreción de CXCL1/MIP-2, y la migración de neutrófilos al peritoneo (Brodsky et al., 2002; Oliveira et al., 2004).. La activación de TLR4 se ha propuesto como un evento esencial para la activación de la respuesta inflamatoria y para la resistencia ante la infección con *T. cruzi*, dado que los ratones deficientes en este receptor (C3H/HeJ), no pueden controlar la replicación del parásito en las primeras etapas de la infección comparados con los ratones silvestres (Oliveira et al., 2004).

Los macrófagos (Villalta et al 1998, Aliberti et al 1999; Cohelo et al., 2002) y cardiomiocitos infectados (Talvani et al., 2000; Damas et al., 2001; Teixeira et al., 2002; Marino

et al., 2004), in vitro, expresan mRNA de CCL2/MCP-1, ligando del receptor CCR2, y CCL3, CCL4 y CCL5, ligandos del receptor CCR5 a lo largo de la infección. Estas quimiocinas se expresan significativamente a partir de los 15 días de la infección experimental en el tejido cardíaco de ratón (Marino et al 2005). Se ha propuesto que estas moléculas durante la fase aguda de la enfermedad tienen un papel promotor de la producción de ON por las células que las producen, en el aumento de la fagocitosis de tripomastigotes por los macrófagos, así como en la migración linfocitaria y monocítica a la zona de daño celular (Villalta et al 1998, Aliberti et al 1999; Cohelo et al., 2002). Otras quimiocinas que se expresan en el músculo cardíaco son CXCL9 y CXCL10 que atraen células productoras de INF- $\gamma$  hacia la zona de proliferación de amastigotes (Talvani et al., 2000; Damas et al., 2001; Teixeira et al., 2002; Marino et al., 2004).

La presencia de estas quimiocinas en el miocardio es importante durante la fase aguda de la enfermedad, dado que contribuyen al control de la parasitemia. Sin embargo se ha propuesto que el mantenimiento de una expresión sostenida de estas moléculas, junto con citocinas como TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , pudiese contribuir al desarrollo de la miocarditis crónica (Reis et al., 1993; Reis et al., 1997; Powell et al., 1998; Talvani et al., 2000, Marino et al., 2005).

Diversos trabajos prueban la importancia de los linfocitos T en el control de la parasitemia tanto en la fase aguda como crónica de la enfermedad de Chagas, sin embargo hay evidencia de que la mayoría de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el miocardio de ratones infectados en fase crónica son autoreactivos o anérgicos, y por lo tanto pudiesen contribuir al desarrollo de miocarditis chagásica severa (Soares et al 1999; Leavey et al., 2003; Martín et al., 2005). Por otra parte los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son una fuente importante de IL-4, citocina que también se ha vinculado con el desarrollo de miocarditis en ratones. De igual forma se registra un aumento en el número de células IL-4<sup>+</sup> que rodean los nidos de amastigotes de tejido cardíaco obtenido a partir de necropsias de pacientes con Chagas crónico (Powell et al 1998).

Se demostró que el aumento en la secreción de las quimiocinas CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CXCL9/MIG y CXCL10/IP-10, junto con el aumento en la expresión de moléculas de adhesión y fibronectina en el miocardio de ratones infectados con *T. cruzi* durante la fase crónica de la enfermedad, pudiese inducir la migración diferencial de linfocitos T a este tejido (dos Santos et al., 2001, Marino et al 2003).

De las quimiocinas que se han analizado durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas CCL2/MCP-1 parece tener un papel muy importante en el desarrollo de miocarditis severa. Los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  y CCL2/MCP-1 en suero de pacientes en fase crónica de la infección por *T. cruzi* se correlacionan con la disfunción del ventrículo izquierdo de estos individuos como mostró un estudio realizado por Talvani y colaboradores en el 2004. Por otra parte el aumento en la secreción de IL4 por linfocitos espléncos de ratones infectados, estimulados con mitógenos, se ha visto que es regulado positivamente por CCL2/MCP-1 (Powell et al., 1998).

Leucocitos periféricos de pacientes con miocarditis severa muestran niveles menores de expresión de CCR5 y CXCR4, respecto de los individuos en fase indeterminada o sanos. En este trabajo no se observó un cambio significativo en la expresión de otros receptores de quimiocinas como CCR1, 2 y 3. Así mismo, un polimorfismo detectado en la región promotora de CCR5 que se asocia a una menor expresión de este receptor fue más frecuente en pacientes con manifestación crónica menos severa que aquellos que presentaban cardiopatía chagásica más severa. (Talvani et al., 2004b). También en monos Rhesus con infección crónica por *T. cruzi*, la ausencia de síntomas se relacionó con una mayor frecuencia de leucocitos periféricos CCR5+ (Marino et al., 2005).

En el modelo murino crónico se sabe que tanto en corazón como en bazo, el 70% de los linfocitos CD8+ expresan altos niveles de CCR5 (Machado et al., 2005). Opuesto a lo observado en el humano, la expresión de CCR5 aumenta en la periferia (Marino et al., 2004). Dicha expresión está directamente regulada por estimulación de estas células con antígeno del parásito (Machado et al., 2005)

El uso de un antagonista del receptor CCR5, denominado Met-RANTES, redujo el número de linfocitos T CD4+ y CD8+ que expresan CCR5 y secretan IL-4, reduciendo la inflamación y el desarrollo de fibrosis en el miocardio de los ratones infectados. El número de macrófagos, granulocitos y células NK, productores de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CCL5 y CCL2/MCP-1 no se vieron afectados (Marino et al., 2004; Marino et al., 2005).

La expresión de CCR5 y sus ligandos son importantes para el control de la parasitemia, dado a que los ratones deficientes para este receptor presentan una mayor mortandad ante la infección por *T. cruzi*. Sin embargo la evidencia tanto en pacientes como en el modelo murino en cuanto a la expresión de CCR5, junto con la expresión aumentada de CCL5/RANTES y

CCL3/MIP-1 $\alpha$ , en el corazón de ratones infectados, sugiere que las quimiocinas CC y sus receptores, son reguladores importantes en la patogénesis de la miocarditis chagásica (Marino et al., 2004).

## **JUSTIFICACIÓN.**

La evidencia generada hasta el momento a partir de modelos murinos de infección por *T. cruzi* y del análisis de muestras de suero y células periféricas de pacientes chagásicos, señala que las quimiocinas CC y sus receptores tienen un papel importante en promover una respuesta adaptativa tipo Th1 durante esta enfermedad. Dicha respuesta se ha asociado al control de la parasitemia durante la fase aguda, y al desarrollo de miocarditis chagásica en la fase crónica. Estos datos fueron obtenidos utilizando cepas suramericanas las cuales tienen características diferentes con respecto de las cepas mexicanas de *T. cruzi* en cuanto a virulencia, el tipo de vector que las transmite y los reservorios a los que coloniza, así como ciertos patrones moleculares. Estas diferencias pudiesen estar relacionadas con manifestaciones patológicas particulares en los pacientes chagásicos en México. El estudio de la expresión de quimiocinas y sus receptores en modelos murinos con cepas mexicanas de *T. cruzi* contribuirá a una mejor caracterización de la enfermedad de Chagas inducida por estas cepas, así como el ampliar el conocimiento de los mecanismos de regulación de la respuesta inflamatoria mediada por quimiocinas durante el desarrollo de una enfermedad como Chagas.

## **HIPÓTESIS.**

Durante la infección con *T. cruzi* hay una correlación entre los niveles de expresión de las quimiocinas CCL2/MCP-1 y CCL12/MCP-5, y su receptor CCR2 con el grado de la respuesta inflamatoria en el tejido cardíaco de ratones infectados con una cepa mexicana de este parásito. Un aumento en la expresión de estas quimiocinas se podría relacionar también con una mayor susceptibilidad y mortandad de los ratones en este modelo experimental.

CCL3/MIP-1 $\alpha$ , en el corazón de ratones infectados, sugiere que las quimiocinas CC y sus receptores, son reguladores importantes en la patogénesis de la miocarditis chagásica (Marino et al., 2004).

## **JUSTIFICACIÓN.**

La evidencia generada hasta el momento a partir de modelos murinos de infección por *T. cruzi* y del análisis de muestras de suero y células periféricas de pacientes chagásicos, señala que las quimiocinas CC y sus receptores tienen un papel importante en promover una respuesta adaptativa tipo Th1 durante esta enfermedad. Dicha respuesta se ha asociado al control de la parasitemia durante la fase aguda, y al desarrollo de miocarditis chagásica en la fase crónica. Estos datos fueron obtenidos utilizando cepas suramericanas las cuales tienen características diferentes con respecto de las cepas mexicanas de *T. cruzi* en cuanto a virulencia, el tipo de vector que las transmite y los reservorios a los que coloniza, así como ciertos patrones moleculares. Estas diferencias pudiesen estar relacionadas con manifestaciones patológicas particulares en los pacientes chagásicos en México. El estudio de la expresión de quimiocinas y sus receptores en modelos murinos con cepas mexicanas de *T. cruzi* contribuirá a una mejor caracterización de la enfermedad de Chagas inducida por estas cepas, así como el ampliar el conocimiento de los mecanismos de regulación de la respuesta inflamatoria mediada por quimiocinas durante el desarrollo de una enfermedad como Chagas.

## **HIPÓTESIS.**

Durante la infección con *T. cruzi* hay una correlación entre los niveles de expresión de las quimiocinas CCL2/MCP-1 y CCL12/MCP-5, y su receptor CCR2 con el grado de la respuesta inflamatoria en el tejido cardíaco de ratones infectados con una cepa mexicana de este parásito. Un aumento en la expresión de estas quimiocinas se podría relacionar también con una mayor susceptibilidad y mortandad de los ratones en este modelo experimental.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Cuantificar la expresión de CCR2 y sus ligandos CCL2/MCP-1 y CCL12/MCP-5 mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real utilizando modelo murino de la enfermedad de chagas.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Analizar el patrón expresión de las quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL12/MCP-5 y su receptor CCR2 en el tejido cardiaco de ratones BALB/c infectados con la cepa Querétaro de *T. cruzi* durante las primeras horas, y hasta los 28 días de la infección experimental.
- Comparar el patrón de expresión de CCR2 con el de receptores de quimiocinas como CCR5 y CX<sub>3</sub>CR1, en el tejido cardiaco.
- Inferir el papel de estas quimiocinas en la modulación de respuesta inflamatoria en el tejido cardiaco en este modelo de infección.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **Parásitos.**

Mediante gradientes de Percoll de 60 y 30% se aislaron trypomastigotes de células VERO infectadas con la cepa Querétaro de *T. cruzi*

### **Cinética de Infección**

A un grupo de 38 ratones de la cepa BALB/c de 4-5 semanas de edad se les inoculó por vía intraperitoneal  $2.3 \times 10^4$  tripomastigotes, forma infectiva del parásito. Los ratones inoculados fueron sacrificados en los tiempos 0, 5, 7, 16, 24 y 48 horas , y 5, 10, 20, 24 y 28 días post-infección. Se extrajo el tejido cardiaco y se congeló en nitrógeno líquido. Los tejidos fueron almacenados a -70°C.

### **Parasitemia.**

Se monitoreo el número de parásitos en sangre retroorbital extraída de cada uno de los ratones antes del sacrificio, utilizando un hemocitómetro.

### **Extracción de ARN total.**

Se extrajo el ácido ribonucleico (ARN) total del tejido cardiaco de los ratones infectados usando de ARN-Stat 60 (1ml/ 500-100mg de tejido). Posteriormente se añadió 0.2ml de cloroformo por cada mililitro de Stat 60 utilizado. Se agitó vigorosamente por 15 segundos y se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4°C. Se apreciaron dos fases resultado de la centrifugación, de las cuales se tomó la fase acuosa, que contiene el ARN, y se colocó en un tubo limpio. Se agregó 0.5 ml de isopropanol a la fracción aislada, por cada ml de STAT 60 usado inicialmente. Se dejó reposar a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos y se centrifugó bajo las condiciones ya mencionadas durante 30 minutos para que el ARN se precipitara. El isopropanol se separó usando vacío y se añadió etanol al 75%. Se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos a 4°C para lavar el ARN. El etanol se eliminó mediante vacío. El botón de ARN se resuspendió en agua esteril bidestilada tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para evitar la degradación por endonucleasas, y fue almacenado a -70°C para su uso posterior.

### **Tratamiento de ARN**

El ARN fue tratado para eliminar los restos de ADN utilizando 10 u/μl de ADNsa I, ARNsa Sin (Roche), para un volumen de ARN equivalente a 20μg/μl. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se añadió 1μl de EDTA (25mM) para inactivar la reacción durante 15 minutos a 65°C.

### **Síntesis de ADNc.**

A partir del ARN total obtenido se sintetizó ADN de una cadena (ADNc) utilizando la enzima MML-V transcriptasa reversa (Invitrogen). En este procedimiento se utilizaron 5 μg del ARN total obtenido por muestra. Se preparó una reacción con 250 ng de random primers [500 μ□/μ□] , 1 μl de mezcla de dNTP 10mM y se llevó a un volumen total de 12 μl con agua tratada con DEPC. Cada tubo se incubó a 65°C durante 5 minutos y se le añaden 7 μl de la mezcla de reacción indicada en la tabla 5.

Tabla 5. Mezcla de reacción para síntesis de ADNc

Reactivo	Volumen por reacción
First-strand Buffer 5X	4 μl
DTT 0.1 M	2 μl

Posteriormente las muestras fueron incubadas a 25°C por 10 minutos y a 37°C durante 2 minutos. Se agregó 1 µl MML-V a cada tubo incubando a 35°C 50 minutos. La reacción se detuvo elevando la temperatura a 70° C 15 minutos. El ADNc obtenido se almacenó a -70°C hasta su uso.

### PCR semicuantitativo.

El ADNc obtenido se amplificó con los primers correspondientes indicados en la tabla 6.

Tabla 6. Secuencia de los oligos de quimiocinas utilizadas en el análisis. Se indica el tamaño aproximado del producto obtenido por PCR para cada uno de los oligos.

Gen	Secuencia	Tamaño del producto (pares de bases)
CCR2	Sentido 5' CATTTGACCCCCACATAGGGAT Antisentido 5'TTGTTGGAGAGAAGTTCCGAAGG	230
CCL2/MCP-1	Sentido 5' TGATCCCAATGAGTAGGCTG sentido 5' GGGCAGATGCAGTTTTAAAT	201
CCL12	Sentido 5' TTTCCACACTTCTATGCCTCC Antisentido 5' CCA GTA TGG TCC TGA AGA TCA	201
CCR5	Sentido 5' ATCGTGTAAGCTCAGTCTATACCC Anti sentido 5' GCATGTATCTTGGCCCTCTATGAT	150
CX <sub>3</sub> CR1	Sentido 5' ACAAGAGACTCCACGCTGAC Antisentido 5' ATCGATCCCTTCACTCTGG	150
CX <sub>3</sub> CL1	Sentido 5' CATCCGCTATCAGCTAAACC Antisentido 5' CGGATTCAGGCTTTGTCAG	250
DHFR*	Sentido 5'CCACAACCTCTTCAGTGG Antisentido 5'TTGGCAAGAAAATGAGCTCCTCGTGG	180

\*DHFR: dehidrofolato reductasa.

Se utilizó el 20% de la reacción de ADNc obtenido para cada muestra. A cada muestra se le agregó la mezcla indicada en la tabla 7, y se agregó agua libre de endonucleasas para un volumen final de muestra de 50µl.

Cada muestra se amplificó durante 40 ciclos, cada uno de tres pasos de 94°C, 15segundos, 55°C, 45 segundos, 72°C, 45 segundos.

Tabla 7. Mezcla de reacción para PCR semicuantitativo. Se indica la concentración final de cada uno de los reactantes en una solución con volumen final de 50µl.

Reactivo	1 reacción	Concentración final
Buffer PCR 10X	5µl	1X
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1.5µl	1.5 mM
Mezcla de dNTP 10mM	1µl	0.2mM
Mezcla de primers 10 µM	2µl	0.4µM
ADNc	2µl	1µg
<i>Taq</i> polimeraza 5u/µl	0.2µl	1u

### Geles de electroforesis

Se utilizaron geles de agarosa para electroforesis de ácidos nucleicos, para la visualización de el ARN total, el ARN tratado con DNAsa, y los productos de PCR. En el caso de los geles de ARN, se utilizaron geles de agarosa al 1% (1g/100ml) en buffer de electroforesis tris-acetato-EDTA (TAE) a una concentración 1X preparado con agua tratada con DEPC. Para los productos de PCR se utilizaron geles de agarosa al 2% en TAE 1X

preparado con agua bidestilada. La electroforesis se realizó a 100 voltios durante 45 minutos en cámara de electroforesis horizontal (BioRad®).

### **Análisis densitométrico de productos de RT-PCR a partir de geles de azarosa.**

A partir de fotos digitales de los geles de electroforesis de productos de RT-PCR de los genes de quimiocinas bajo estudio, se realizó una densitometría de las bandas de producto para cada uno de los tiempos de infección experimental. Se utilizó el programa de análisis de imágenes ImageJ distribuido gratuitamente en línea por el National Institute of Health (NIH), USA.

Las imágenes fueron analizadas en un formato de escala de grises. Se delimitó un perímetro y área constante, y el programa determinó el valor de absorbancia de cada una.

Se graficó el valor de la razón para cada tiempo de infección, definida como el valor obtenido para cada gen, en cada tiempo de infección, entre el valor obtenido para el gen DHFR en el mismo tiempo de infección.

### **PCR tiempo real.**

La reacción de PCR se llevó a cabo empleando el 20 % de ADNc obtenido por muestra utilizando el reactivo SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), reactivo fluorescente que se intercala en las hebras de doble cadena permitiendo detectar y graficar la amplificación de producto con forme ocurre el PCR. Las condiciones de amplificación fueron las mismas utilizadas para PCR cualitativo.

A cada reacción se le agregó una mezcla de los reactivos indicados en la tabla 8, llevando aun volumen final de 25µl por reacción con agua libre de endonucleasas.

Tabla 8. Mezcla de reacción para PCR en tiempo real. Se indica la concentración final de cada uno de los reactantes en una solución con volumen final de 50µl.

Reactivo	2X	Concentración final
Mix de primers 10 µM	4µl	0.8µM
SYBER GREEN 2x	25µl	1X
ADNc	2µl	1µg

El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el Software ABI Prism 7000 SDS y Microsoft Excel XP. Las diferencias entre la expresión de los diferentes genes bajo análisis se analizaron a partir de la ecuación  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen, 2001), donde 2 se refiere a la máxima eficiencia de amplificación de un par de oligos bajo las condiciones experimentales establecidas, calculando el valor de  $\Delta\Delta CT$  a partir de la ecuación:

$$\Delta\Delta CT = (CT_{\text{tiempo X}} - CT_{\text{tiempo control}})_{\text{gen analizado}} - (CT_{\text{tiempo X}} - CT_{\text{tiempo control}})_{\text{gen control interno}};$$

siendo CT el ciclo de amplificación exponencial de cada par de oligos, el cual se determinó a partir de la gráfica de amplificación de fluorescencia con respecto del ciclo de amplificación registrada por el software ABI Prism 7000.

Los valores de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , de tres experimentos por cada gen fueron promediados y graficados como expresión relativa del gen con respecto de los tiempos de infección analizados.

Dado a que los valores de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , muestran incremento en la expresión de un gen en una condición X respecto de una condición control en número de veces más o menos de expresión, como análisis estadístico se realizó el cálculo del error estándar para el valor promedio de cada gen en cada tiempo de infección.

## **Resultados.**

Se utilizaron 5 ratones por tiempo de infección, los cuales fueron inoculados con  $25 \times 10^3$  tripomastigotes de la cepa Querétaro de *T. cruzi*, por vía intraperitoneal. Se monitorio la parasitemia antes de cada sacrificio, a partir de 40  $\mu$ l de sangre obtenida por punción retro orbital utilizando un hemocitómetro. Los ratones se sacrificaron a las 5, 23 y 42 horas y a los 5, 10, 15, 20 y 28 días postinfección. Posteriormente se extrajo el tejido cardiaco de cada ratón, el cual fue congelado en nitrógeno líquido y preservado a  $-70^\circ\text{C}$ , para la posterior extracción de ARN total. Se registraron los cambios físicos en el ratón a los diferentes tiempos de la infección experimental.

### **Parasitemia y Supervivencia.**

Los parásitos fueron detectados en sangre a partir de los 5 días postinoculación ( $4.68 \times 10^4/\text{ml}$ ), y se fueron incrementando hacia el día 28 (Fig.2A). Al termino de la infección experimental, el porcentaje de supervivencia de los ratones se redujo a un 75%; las primeras muertes ocurrieron a los 20 días (Fig.2B).

### **Características físicas de los ratones infectados.**

A partir de los 15 días después de la infección, se registraron cambios físicos en los ratones inoculados. Los cambios fueron posteriormente monitoreados a los 20 y 28 días.

A los 15 días postinfección se detectó erizamiento del pelo y esplenomegalia; no se observó ningún cambio en el resto de los órganos. En el día 20 se registró también erizamiento de pelo y esplenomegalia, además de la parálisis de los miembros pélvicos y la curvatura de las extremidades posteriores. Hacia los 28 días después de la inoculación se mantuvieron las características de pelo erizado y deformidad de las extremidades posteriores, se registró inflamación de ganglios linfáticos, y el bazo redujo su tamaño hasta aquel de un ratón normal.

No se detectaron cambios en la arquitectura del corazón durante este modelo experimental macroscópicamente. Sin embargo la tinción con hematoxilina-eosina (H-E) de cortes de corazón de ratones controles y sacrificados a los 15 y 30 días después de la inoculación con *T. Cruzi*, permitieron observar un incremento en el infiltrado inflamatorio al miocardio (Fig. 3, 4 y 5). Los tipos celulares infiltrantes en los cortes de tejido cardiaco fueron principalmente células mononucleares.

## **Expresión de quimiocinas en tejido cardiaco.**

### **Análisis por RT- PCR semicuantitativo.**

A partir del ARN total extraído del corazón de ratones BALB/c infectados con la cepa Querétaro (Fig.6), se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativo para comprobar y analizar la expresión relativa, en cuanto a ARN mensajero (ARNm) de los genes de las quimiocinas CCL2/MCP-1 y CCL12/MCP-5 junto con su receptor CCR2 y el receptor CCR5, así como CX3CR1 y su ligando CX3CL1/Fractalcina.

La expresión de estas quimiocinas se detectó por RT-PCR semicuantitativo desde el tiempo cero de infección con *T. cruzi*, lo que indica su expresión constitutiva en corazón.

Se realizó una densitometría de las bandas de amplificación de quimiocinas y sus receptores a partir de un gel de agarosa al 2% (Fig. 7) utilizando el software ImageJ de análisis de imágenes (National Institute of Health, USA). Se graficó el valor de la razón para cada tiempo de infección, definida como el valor obtenido para cada gen, en cada tiempo de infección, entre el valor obtenido para el gen DHDR en el mismo tiempo de infección.

En el caso de CCR2 (Fig. 8A), el análisis densitométrico mostró, un incremento en la expresión de este receptor en el tejido cardiaco en los días 10 y 28 de la infección experimental, por arriba de la condición control.

La gráfica del receptor CCR5 (Fig.8B) muestra una tendencia general de aumento de este receptor en tejido cardiaco conforme progresa la infección, siendo a las 23h, los 10 días y los 28 días donde se registra un aumento en el ARNm, respecto del tiempo cero.

El patrón observado para las quimiocinas CCL2/MCP-1 y CCL12/MCP-5 (Fig. 8C y D) a partir de densitometría, muestran un nivel muy alto de expresión de estas quimiocinas en el corazón del ratón control. Los datos obtenidos para los diferentes tiempos de infección apuntan hacia una disminución en la expresión de estas quimiocinas asociada a la infección por *T. Cruzi*, dado a que los valores de densidad se mantienen por debajo de los de la condición control.

Por otra parte, las graficas de CX3CL1/Fractalcina y CX3CR1 (Fig. 8E y F) muestran un aumento significativo, con respecto de la condición control en el día 28 de la infección.

### **Análisis de la expresión de quimiocinas por PCR en tiempo real.**

Tomando en cuenta los datos obtenidos en cuanto al patrón de expresión de quimiocinas y sus receptores por densitometría, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real para confirmar o modificar dichos datos.

Los datos de CT obtenidos para CCR2, CCL2/MCP-1, CCL12/MCP-5, CCR5, CX3CR1, y CX3CL1/Fractalcina fueron analizados y graficados como expresión relativa del gen con respecto del tiempo de infección.

#### **Expresión de CCR2.**

No se registró un incremento significativo en la expresión de este receptor en las primeras horas postinfección respecto al ratón sacrificado al tiempo cero (Fig. 9). Sin embargo, hacia los 10 días de la infección experimental se registra un aumento en el ARNm para CCR2, 16 veces mayor que el ratón control. Dicho aumento, se mantiene hasta el término del modelo experimental, siendo a los 15 días postinfección, donde se registra una mayor expresión de esta molécula.

#### **Expresión CCL2/MCP-1**

En el caso de CCL2/MCP-1 la cinética de expresión de esta quimiocina, es similar a la observada para su receptor, con un incremento constante en la síntesis de ARN mensajero, hacia los tiempos largos de infección (Fig. 10B). Sin embargo, en el caso de CCL2/MCP-1 se observa un incremento significativo de la expresión de esta molécula desde las 5 horas post inoculación, en comparación al ratón sacrificado al tiempo cero. Dicha expresión no cambia significativamente entre las 5 y las 42 horas (Fig.10A).

#### **Expresión de CCL12/MCP-5**

Se registró un aumento significativo en el ARNm para CCL12/MCP-5 a partir de los 5 días de la infección experimental, con respecto del ratón sacrificado al tiempo cero (Fig. 11 A y B). La expresión de este gen aumenta progresivamente hacia los 28 días postinfección, donde se reporta un incremento de casi ochenta veces con respecto de la condición control.

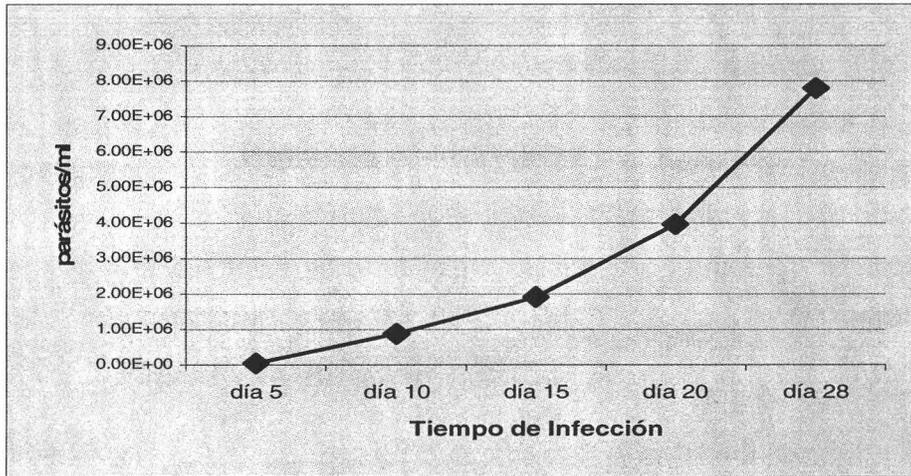
### **Expresión de CCR5.**

Al analizar la cinética de expresión del receptor CCR5, se observó un patrón similar al de CCR2, hasta los 28 días de infección donde CCR5 incrementa su expresión alrededor de 1100 veces con respecto del tiempo cero de infección (Fig. 12).

### **Expresión de Fractalcina y su Receptor.**

Las gráficas de expresión relativa de los genes de CX3CL1/Fractalcina y su receptor CX3CR1 a partir de datos cuantitativos muestran un incremento significativo asociado a la infección a partir del día 5, siendo 3 veces mayor al control el día 20 después de la inoculación (fig. 13 A y B).

A



B

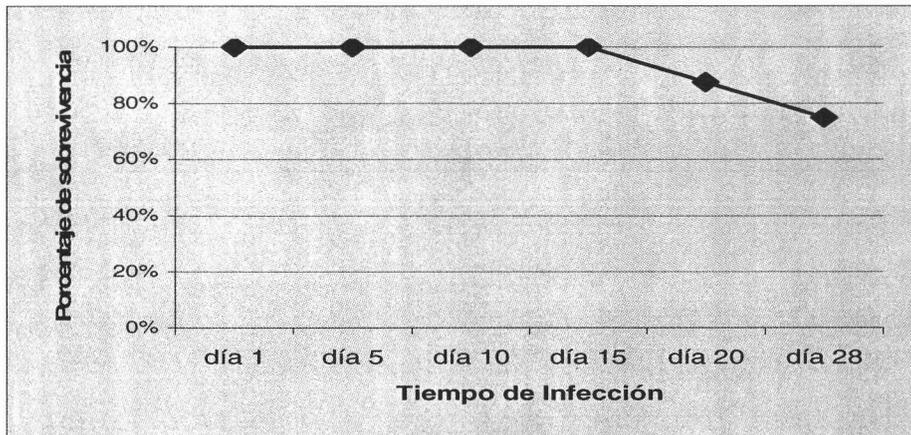


Figura 2. Curvas de parasitemia (A) y supervivencia (B) de ratones BALB/c infectados con  $25 \times 10^3$  tripomastigotes de *T. cruzi*, cepa Querétaro. La cuenta de parásitos en sangre se realizó en el microscopio óptico, a partir de  $40 \mu\text{l}$  de sangre retroorbital, utilizando un hemocitómetro. Los números de parásitos por mililitro de sangre obtenida de cada ratón fueron promediados y graficados con respecto del tiempo de infección.

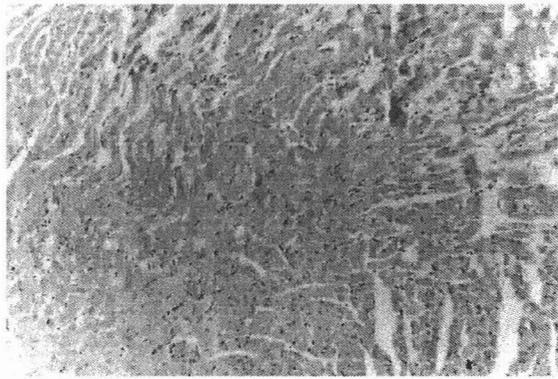


Figura 3. Corte longitudinal de corazón de un ratón BaALB/c no inoculado con *T. cruzi*. No se observa infiltrado inflamatorio entre las fibras cardiacas. Aumento 100X. Tinción H-E.

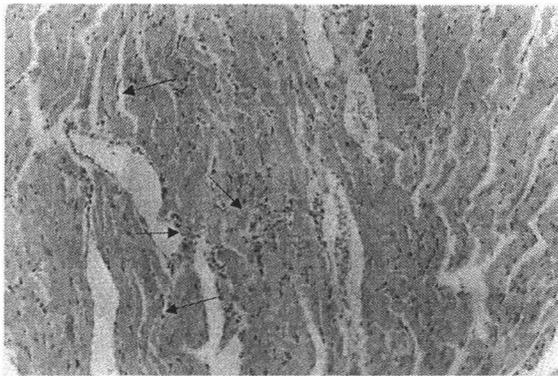


Figura 4. Corte longitudinal de corazón de un ratón inoculado con *T. cruzi* sacrificado a los 15 días de infección. Se observa infiltrado inflamatorio (señalado con flechas) cercano a los vasos sanguíneos, y entre las miofibrillas. Aumento 100X. Tinción H-E.

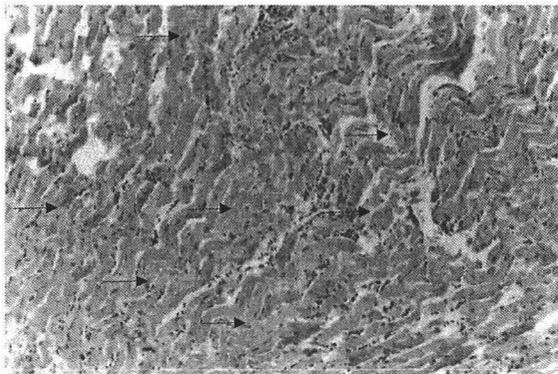


Figura 5. Corte longitudinal de corazón de un ratón BALB/c inoculado con *T. cruzi* y sacrificado a los 30 días de infección. Se observa un aumento en el infiltrado inflamatorio (señalado con flechas) entre las fibras cardiacas, con respecto del día 15 de infección. Aumento 100X. Tinción H-E.

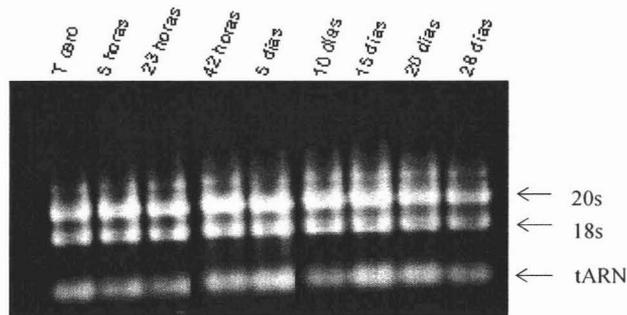


Figura 6. ARN total obtenido de tejido cardiaco de ratones infectados con *T. cruzi* a diferentes tiempos de infección.

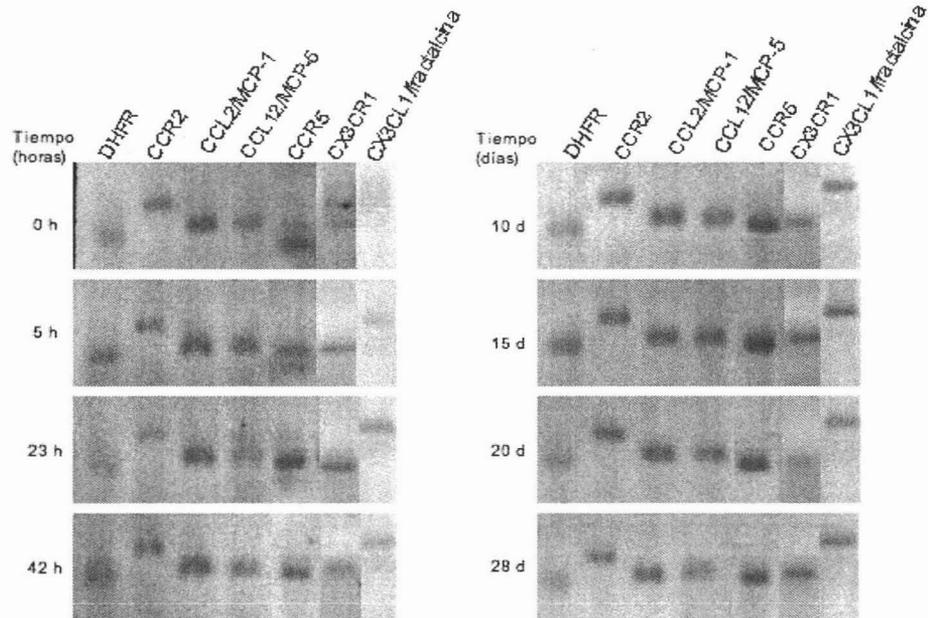


Figura 7. Productos de amplificación por PCR semicuantitativo de los genes DHFR, CCR2, CCL2/MCP-1, CCL12/MCP-5, y CCR5 a partir de tejido cardiaco. Análisis por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

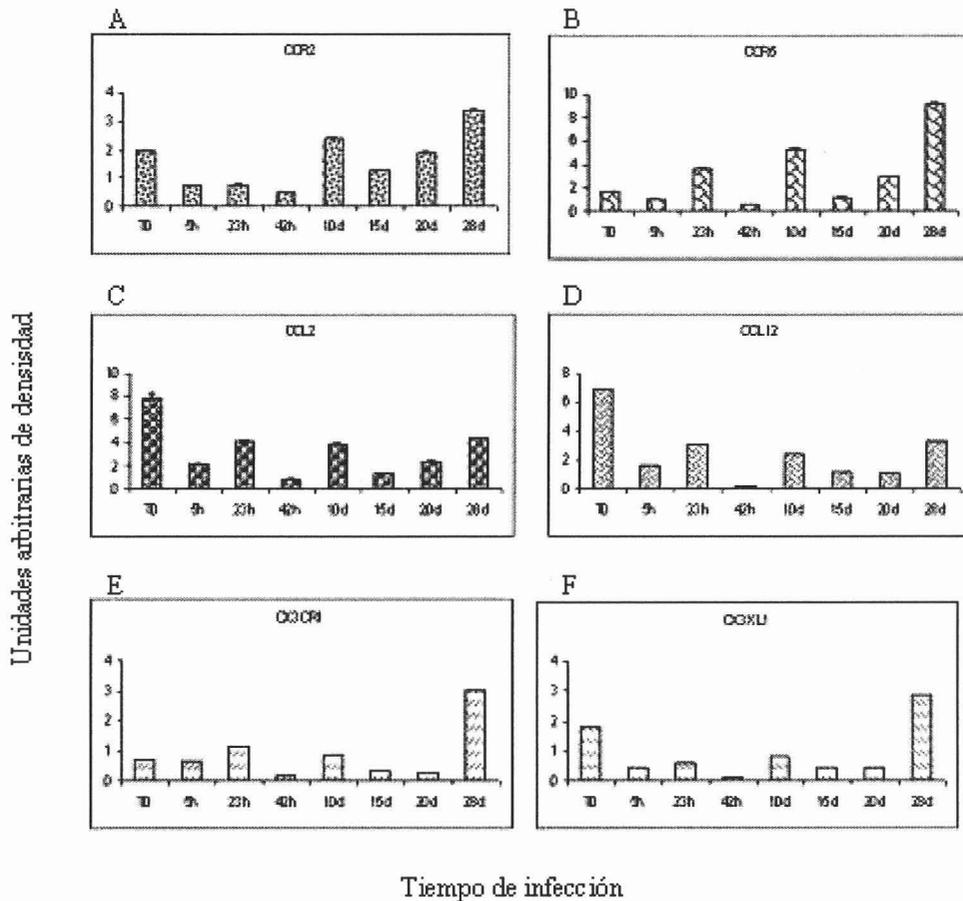


Figura 8. Análisis densitométrico de la expresión de quimiocinas y sus receptores en el tejido cardiaco. Se realizó una densitometría de los productos de amplificación de RT-PCR semicuantitativo en geles de agarosa al 2%, utilizando el software ImageJ, distribuido en línea por el National Institute of Health, USA. A) CCR2, B)CCR5, C)CCL2/MCP-1, D)CCL12/MCP-5, E)CX3CR1, F)CX3CL1/fractalcina.

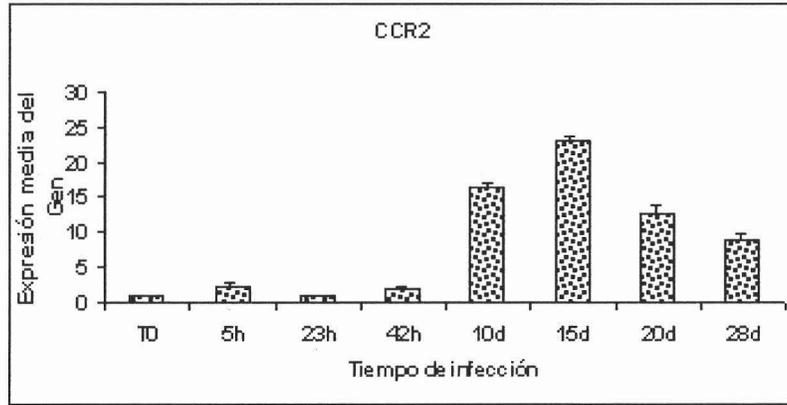


Figura 9. Análisis por PCR tiempo real de la expresión de CCR2 en tejido cardiaco de ratones infectados. Ratones BALB/C fueron infectados con  $25 \times 10^3$  tripomastigotes de la cepa Querétaro, y sacrificados a diferentes tiempos post inoculación. Se grafica el valor  $2^{-DDCT}$  de cada uno de los tiempos de infección como expresión media del gen. Promedio de tres experimentos.

CCL2/MCP-1

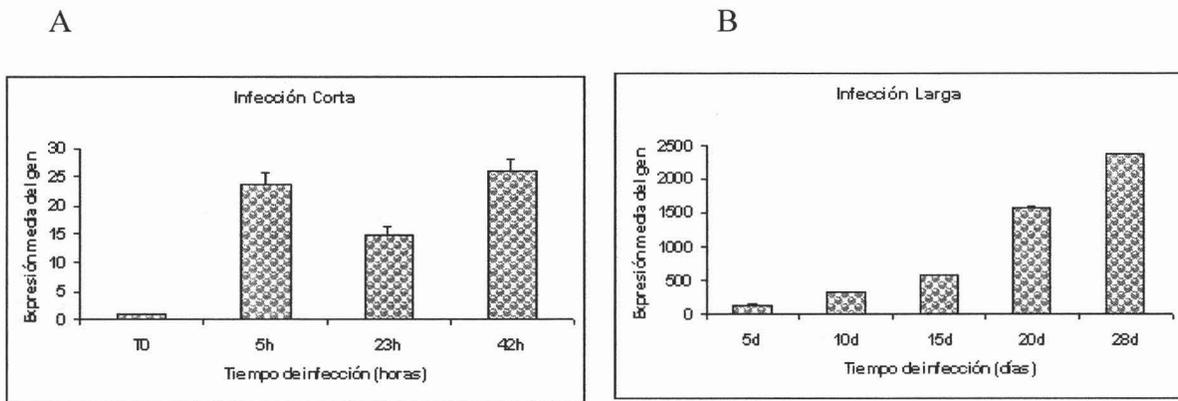
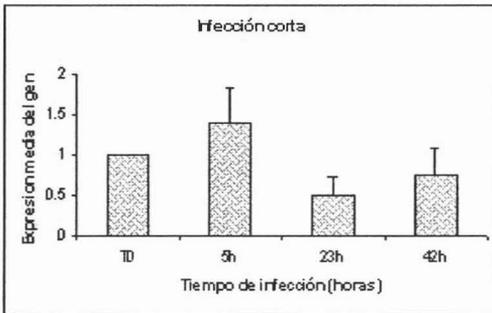


Figura 10. Análisis por PCR tiempo real de la expresión de CCL2/MCP-1 en tejido cardiaco de ratones infectados. Ratones BALB/C fueron infectados con  $25 \times 10^3$  tripomastigotes de la cepa Querétaro, y sacrificados a tiempos cortos (A) y largos (B) post inoculación. Se grafica el valor  $2^{-DDCT}$  de cada uno de los tiempos de infección como expresión media del gen. Promedio de tres experimentos.

## CCL12/MCP-5

A



B

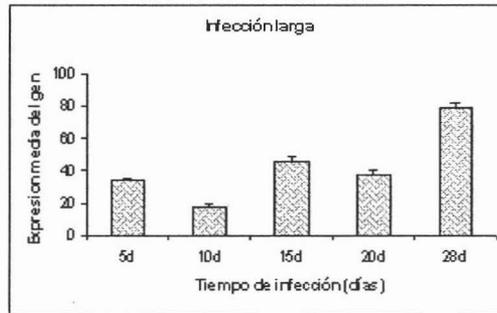


Figura 11. Análisis por PCR tiempo real de la expresión de CCL12/MCP-5 en tejido cardíaco de ratones infectados. Ratones BALB/C fueron infectados con  $25 \times 10^3$  tripomastigotes de la cepa Querétaro, y sacrificados a tiempos cortos (A) y largos (B) post inoculación. Se grafica el valor  $2^{-DDCT}$  de cada uno de los tiempos de infección como expresión media del gen. Promedio de tres experimentos.

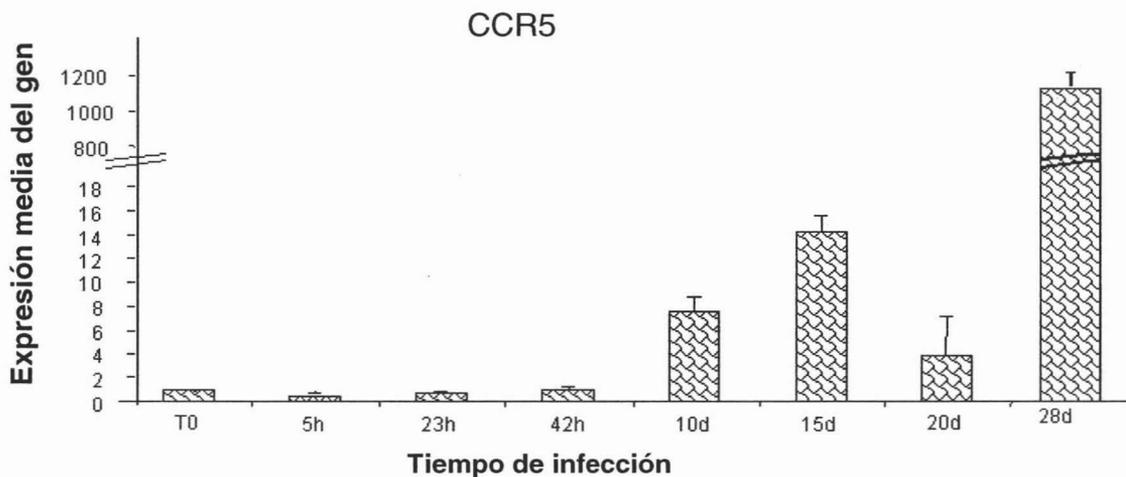


Figura 12. Análisis por PCR tiempo real de la expresión de CCR5 en tejido cardíaco de ratones infectados. Ratones BALB/C fueron infectados con  $25 \times 10^3$  tripomastigotes de la cepa Querétaro, y sacrificados a diferentes tiempos post inoculación. Se grafica el valor  $2^{-DDCT}$  de cada uno de los tiempos de infección como expresión media del gen. Promedio de tres experimentos.

A

B

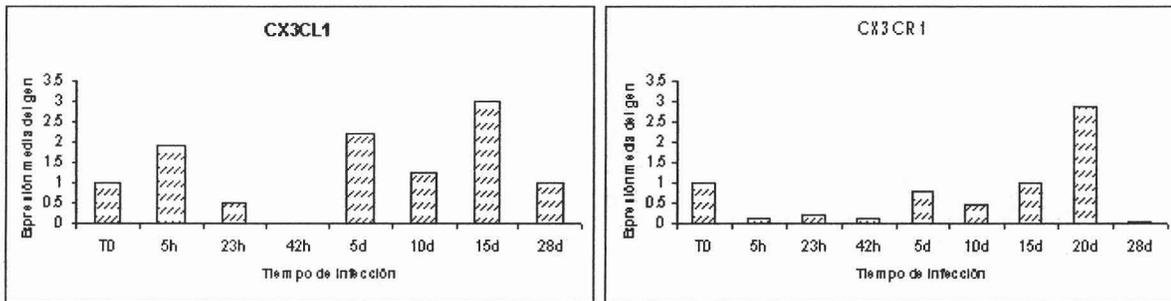


Figura 13. Análisis por PCR tiempo real de la expresión de CX3CL1/Fractalcina (A) y CX3 CR1 (B) en tejido cardíaco de ratones infectados. Ratones BALB/C fueron infectados con  $25 \times 10^3$  tripomastigotes de la cepa Querétaro, y sacrificados a diferentes tiempos post inoculación. Se grafica el valor  $2^{-DDCT}$  de cada uno de los tiempos de infección como expresión media del gen. Promedio de tres experimentos..

## Discusión.

La enfermedad de Chagas es un padecimiento caracterizado por un proceso inflamatorio en que la modulación de la respuesta inmune juega un papel muy importante.

En ensayos *in vitro*, en modelo murinos, y en pacientes, se ha demostrado que las quimiocinas participan en el control de la parasitemia durante la fase aguda en la enfermedad de Chagas al promover una respuesta adaptativa de tipo Th1. Por otra parte se ha propuesto que contribuyen al desarrollo de miocarditis chagásica severa durante la fase crónica de infección (Machado et al., 2000 y 2005; Talvani et al., 2000 y 2002; Aliberti et al., 2001; Chen et al., 2001; dos Santos et al., 2001; Coelho et al., 2002; Teixeira et al., 2002; Ouaiissi et al., 2002; Marino, 2004 y 2005; Oliveira, 2004)

CCL2/MCP-1 es una de las primeras quimiocinas que se expresan en el tejido cardiaco y participa en el montaje de la respuesta inflamatoria ante *T. cruzi* (Cohelo et al 2002; Campos et al 2004). Su función principal es estimular la migración de macrófagos y linfocitos T hacia los órganos infectados, así como la producción de óxido nítrico por macrófagos y cardiomiocitos ( Villalta et al 1998; Aliberti et al 1999; DosReis 1997; Talvani et al., 2000; Teixeira et al., 2002; Marino et al 2004). Durante la fase crónica, la expresión sostenida de esta quimiocina, junto con altos niveles de citocinas como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-4, se ha correlacionado con la atrofia del ventrículo izquierdo, que es una característica de la miocarditis chagásica (Powell et al., 1998; Abel et al., 2001; Talvani et al., 2004; Marino et al., 2005). La quimiocina CCL2/MCP-1 y su receptor CCR2 son moléculas cuya expresión en altos niveles es determinante para la progresión de condiciones patológicas tales como la arteriosclerosis (Daly y Rollins, 2003), el infarto del miocardio (Voevoda et al., 2001), cardiomiopatía dilatada (Lehmann et al., 1998), isquemia del miocardio (Tarzami et al., 2002), miocarditis y la falla cardiaca crónica (Damas et al., 2001). Sin embargo, se desconoce el papel de CCR2 en la respuesta inflamatoria ante *T. cruzi*.

Se ha reportado que la expresión de las quimiocinas CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  y CCL5/RANTES en el tejido cardiaco se relaciona con la eliminación de parásito por la inducción de la liberación de radicales de oxígeno (Villalta et al., 1998; Aliberti et al., 1999; Talvani et al., 2000; Cohelo et al., 2002; Teixeira et al., 2002; Marino et al 2004). También se ha propuesto que estas quimiocinas influyen en el desarrollo de la miocarditis chagásica crónica severa, dado que induce la migración de linfocitos T que expresan el receptor CCR5 al

miocardio (Reis et al., 1993; Calzada et al., 2001; Talvani et al 2004; Marino et al., 2004; Machado et al., 2005) . Dichos linfocitos T, reaccionan tanto ante antígenos del parásito como propios, y producen altos niveles de IL-4 (Higuchi et al., 1993 y 1997; Powell et al., 1998; Soares et al., 1999; dos Santos et al., 2001; Lannes-Vieira et al., 2003; Leavey et al., 2003; Martín et al., 2005) citocina de tipo Th2 que regula negativamente la expresión de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-12 entre otras citocinas proinflamatorias (Rot y von Andrian, 2004).

Actualmente los datos experimentales publicados sobre la correlación entre la expresión de quimiocinas y enfermedad de Chagas, se han generado a partir de cepas suramericanas de *T. cruzi*, las cuales se diferencian genotípicamente de las cepas predominantes en México (Espinoza et al., 1998; Bosseno et al 2002; Macedo et al 2004), por lo que es importante el estudio de la respuesta inmune ante cepas mexicanas.

Con el fin de inferir la participación de las quimiocinas y sus receptores en un modelo murino de infección con la cepa Querétaro de *T. cruzi* se analizó el patrón de expresión del receptor CCR2 y sus ligandos en CCL2/MCP-1 y CCL12/MCP-5 en el tejido cardiaco de ratones infectados con la cepa Querétaro de *T. cruzi*. Dicha expresión se comparó también con la de los receptores CCR5 y CX<sub>3</sub>CR1.

Se ha reportado que ante la infección por vía intraperitoneal de ratones BALB/c con  $10 \times 10^3$  y  $100 \times 10^3$  tripomastigotes de la cepa Querétaro, se observan parásitos en circulación entre los 5 y 7 días con el inoculado menor, y entre los 2 y 4 días con en el inoculado mayor. El pico de parasitemia, en ambos casos se detecta entre los 25 y 28 días, con una mortandad del 50% a los 42 días para el primer caso y 36 días para el segundo caso, y una mortalidad total en los días 53 a 57 en ambos casos, en promedio dos días después de la desaparición de los parásitos del torrente sanguíneo (Sosa Aguilar, 2003). Estos datos nos permiten afirmar que en nuestro modelo experimental, el pico de parasitemia se registró a los 28 días postinfección, limitando el análisis de la expresión de quimiocinas en tejido cardiaco a la primera fase de la infección aguda.

El análisis de la expresión de quimiocinas y receptores se realizó tanto por densitometría de imágenes de los productos de PCR semicuantitativo en geles de agarosa, como por la técnica de RT-PCR en tiempo real (Livak y Schmittgen, 2001).

Los resultados obtenidos a partir del análisis densitométrico muestran fluctuaciones en la expresión de los receptores CCR2 y CCR5 con una tendencia al incremento en sus niveles

de ARNm, respecto al tiempo cero, hacia el término de la infección experimental. Por otra parte, la densitometría de las bandas de producto de PCR de los ligandos de CCR2, CCL2/MCP-1 y CCL12/MCP-5, mostró un decremento en la expresión de estas quimiocinas respecto a la condición control. En el caso de CX3CR1 y su ligando, solo se registró un cambio significativo en la expresión de estas moléculas hacia el día 28 de la infección experimental. Estos resultados no se correlacionan con lo mostrado por el análisis de tiempo real, que muestra patrones de expresión diferentes para cada una de las quimiocinas y receptores analizados.

La poca concordancia entre los resultados obtenidos por ambos métodos puede deberse a tres factores principales: 1) el método de PCR en tiempo real cuantifica las diferencias en la amplificación de producto en la fase exponencial de amplificación, mientras que la densitometría de geles evalúa los productos de amplificación en la fase final (estacionaria) de la reacción de PCR. Durante la fase exponencial de la reacción de PCR, los reactivos se encuentran en exceso, por lo que la duplicación del ADN de una cadena ocurre de manera constante conforme progresa dicha fase. Una vez que los reactivos empiezan a restringirse o agotarse, la duplicación del ADN se reduce, y finalmente se detiene (Applied Biosystems, 2005). Se ha calculado la una fase estacionaria comienza aproximadamente a los 35 ciclos de amplificación (Ponchel et al., 2003), sin embargo, las muestras no llegan a este punto bajo las mismas condiciones de amplificación del producto, sin importar si son duplicados. Por lo que la cuantificación a partir de la fase exponencial y la estacionaria de amplificación, será más exacta, dado a una menor variación entre los duplicados (Applied Biosystems, 2005). 2) El nivel de detección del producto a partir de un gel de agarosa es mucho menor que el logrado a partir de la técnica de PCR en tiempo real. La intensidad de fluorescencia del compuesto SYBR® Green I utilizado durante el procedimiento de PCR en tiempo real es muchas veces mayor al del Bromuro de Etidio, compuesto comúnmente usado para visualizar ácidos nucleicos en geles de agarosa. Esta diferencia permite identificar a partir de dos copias de producto con el software de tiempo real, mientras que la fluorescencia del Bromuro de Etidio permite distinguir a partir de 10 copias de producto (Applied Biosystems, 2005). Finalmente, 3) las unidades en las que fueron obtenidos los datos y el procesamiento de los mismos antes de la graficación fue diferente. En el caso de los datos densitométricos, solo se calculo el radio del valor obtenido para cada uno de los genes de quimiocinas y receptores analizados, respecto al valor del gen control correspondiente a cada tiempo de infección. Para los datos de tiempo

real se utilizó la ecuación  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , la cual compara cada uno de los valores de CT obtenidos para cada una de las muestras respecto al valor del gen control para cada tiempo de infección, y respecto a la condición control experimental (infección al tiempo cero) (Livak y Schmittgen, 2001).

Dado que la técnica de PCR en tiempo real ha mostrado ser más sensible en la cuantificación del número de copias resultado de la amplificación, la discusión se realizó con base en estos datos (Applied Biosystems, 2005; Ponchel et al., 2003; Valasek y Repa, 2005).

Se ha reportado que CCR2 se expresa basalmente en células endoteliales y fibroblastos (Murdoch y Finn, 2000). Estos antecedentes y los datos obtenidos en este trabajo de RT PCR tanto semicuantitativo como en tiempo real, muestran que la expresión de este receptor en tejido cardiaco es constitutiva. También se ha registrado la expresión de CCR2 en células de músculo liso y estriado (Murdoch y Finn, 2000); sin embargo, no se ha reportado la expresión de este u otros receptores de quimiocinas en cardiomiocitos.

En el presente trabajo no es posible determinar la posible contribución de los cardiomiocitos en la expresión basal y el incremento del RNAm de CCR2, dado que la fuente de material biológico para análisis fue RNA del tejido total.

A partir del análisis de la expresión relativa del gen de CCR2 en tejido cardiaco por RT PCR en tiempo real, se pudo observar que la infección por *T. cruzi* induce el aumento del RNAm para este receptor, con respecto de la condición control, a partir del día 10 de infección. La expresión relativa del gen aumenta hacia los 15 días, y posteriormente, disminuye hacia el día 28.

Este aumento en la cantidad de RNAm de CCR2 puede reflejarse en un incremento en el infiltrado de células que expresan este receptor en el tejido cardiaco. En modelos murinos de infección se observó que la expresión de CCR2 es importante para el montaje de una respuesta adaptativa de tipo Th1, la cual se ha asociado a la eliminación de parásito (Abrahamson et al., 1996; Tarleton et al., 2000, Müller et al 2001; Hoft et al., 2002). Así, la migración de macrófagos y linfocitos T que expresan CCR2 en el miocardio pudiesen contribuir a la polarización y mantenimiento de una respuesta tipo Th1 durante el periodo inicial de la respuesta aguda, donde los tripomastigotes también acceden al tejido vía circulación sanguínea. La disminución de la expresión de CCR2 en corazón en el tiempo donde se registra el pico de parasitemia (28 días), con respecto de los tiempos anteriores,

refleja una disminución en la migración y apoptosis de las células que expresan este receptor, principalmente macrófagos (Mack et al., 2001), resultado de un probable cambio en el patrón de citocinas en el tejido, en este periodo de la infección.

En el caso del modelo experimental de infección con la cepa Querétaro de *T. cruzi*, los ratones BALB/c, clasificados como susceptibles a la enfermedad de Chagas, no sobreviven a la fase aguda (Sosa-Aguilar 2003). Este fenómeno de susceptibilidad y mortandad pudiese estar relacionado con una menor expresión del receptor CCR2 en el tejido cardiaco.

Los ratones de la cepa C57BL/6, resistentes a la infección por *Leishmania major*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Schistosoma mansoni*, al ser depletados del receptor CCR2 presentan patologías muy similares a aquellos ratones susceptibles a estas enfermedades (BALB/c) (Sato N et al., 2000; ). A sí mismo los ratones que no expresan el receptor muestran deficiencias en la migración de células dendríticas estimuladoras de la respuesta Th1 hacia órganos linfoides secundarios (Boering et al., 1997; Sato et al., 2000; Peters et al., 2000), y en la capacidad de los linfocitos T de secretar INF- $\gamma$ , evento que es dependiente de la señalización de CCR2 (Peters et al., 2000) .

La señalización de TLR2, en la superficie de las células dendríticas y macrófagos residentes en los tejidos, por mucinas del parásito asociadas a GPI, tiene como consecuencia la síntesis de CCL2/MCP-1 (Cohelo et al., 2002). Se ha reportado que los cardiomiocitos también expresan TLR2 y TLR4 (Frantz et al., 1999 y 2001), por lo que potencialmente pueden producir CCL2/MCP-1, y otras quimiocinas a través de la activación y la señalización de estos receptores. A su vez, INF- $\gamma$  estimula a los cardiomiocitos, así como a los macrófagos y a los linfocitos T infiltrantes, para que expresen quimiocinas CC principalmente CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , -CCL4/MIP-1 $\beta$  y CCL5/RANTES ( Talvani et al 2000; Teixeira et al., 2002; Marino et al 2004). Estas quimiocinas actúan paracrina y autocrinamente manteniendo la migración y activación celular en el corazón como parte del proceso de regulación de la inflamación y, a su vez, controlando la parasitemia.

En nuestro modelo experimental se observó un aumento significativo en la expresión relativa del gen de CCL2/MCP-1 desde las 5 horas de la infección. Dado a que en este tiempo, el acceso de antígeno o parásitos vía sanguínea al tejido cardiaco es poco probable, un estímulo relacionado con la infección, pudiese inducir el aumento progresivo de esta quimiocina en el miocardio desde fases muy tempranas. Al analizar la cinética

correspondiente a los tiempos largos (días) de infección, se observó un nuevo incremento significativo del RNAm de esta quimiocina a los 5 días de la infección, incremento que continuó hasta el día 28, y mostró una correlación positiva con el incremento de la parasitemia.

A partir de modelos murinos de infección con *Cryptococcus neoformans*, se concluyó que la expresión de CCL2/MCP-1 antes del día 5 después de la inoculación, regula negativamente la migración de eosinófilos al pulmón (Traynor et al., 2002). Probablemente la expresión temprana de CCL2/MCP-1 en corazón tenga una función similar en el control de la eosinofilia en el tejido cardíaco durante la enfermedad de Chagas dado que este tipo celular no constituye una proporción significativa del infiltrado al miocardio en ratones infectados en las diferentes fases de la enfermedad (dos Santos et al., 2001; Marino et al 2003; Talvani et al 2003).

Se reportó que ratones que sobreexpresan sistémicamente la quimiocina CCL2/MCP-1 son altamente susceptibles a las infecciones por *Listeria monocitogenes* y *Micobacterium tuberculosis* (Daly y Rollins; Kurihara et al., 1997; ). Este fenómeno de susceptibilidad está asociado a una reducción de la migración de las células que expresan CCR2 hacia los órganos infectados dado a una desensibilización del receptor en leucocitos periféricos o la inducción de otras citocinas que mantengan un perfil de respuesta tipo Th2, tal como se reportó en estudios in vitro, donde altos niveles de CCL2/MCP-1 estimulan la producción de IL-4 por linfocitos esplénicos de ratones infectados con *T. cruzi* y estimulados con mitógenos (Powell et al., 1998).

Posiblemente, en nuestro modelo experimental, el incremento y la expresión sostenida de CCL2/MCP-1 en el tejido cardíaco, esté directamente relacionado con la polarización de la respuesta adaptativa de tipo Th2 en el corazón, al aumentar los niveles de la citocina IL-4. Esta respuesta tendría como efecto, el mantenimiento de una alta parasitemia en el tejido cardíaco, y por tanto la muerte del ratón al término de la fase aguda de la infección por *T. cruzi*.

Algunos autores han propuesto que el montaje de la respuesta inmune adaptativa de tipo Th1 depende principalmente de la señalización de CCR2 por las quimiocinas CCL7/MCP-3, CCL12/MCP-5 y CCL13/MCP-4 (Lu et al .1998; Daly y Rollings, 2003).

En ausencia del receptor CCR2, CCL2/MCP-1 induce el desarrollo de una respuesta de tipo Th2, probablemente por la señalización de un receptor aún no identificado o a través de la

interacción sinérgica con otras quimiocinas de la misma familia (Lu et al .1998; Van Coillie et al., 1999; Daly y Rollings, 2003).

Este es el primer trabajo donde se analiza la expresión de la quimiocina CCL12/MCP-5 en la enfermedad de Chagas. Esta quimiocina murina, además de tener afinidad por el receptor CCR2, es probablemente el ortólogo de la quimiocina humana CCL13 (Sarafi et al., 1997), por lo que el análisis de su patrón de expresión podría arrojar nuevos datos acerca de la regulación de la respuesta inflamatoria durante la infección por *T. cruzi* en pacientes chagásicos.

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que el patrón de expresión de CCL12/MCP-5 en tejido cardiaco fue similar al de CCL2/MCP-1 a partir del día 5 de infección, con un aumento constante hacia el día 28. Este incremento también tuvo correlación con el aumento en la parasitemia sanguínea.

Se sabe que la expresión de CCL12/MCP-5 está regulada por citocinas como el INF- $\gamma$  y es inducida por LPS, lo cual pudiese involucrar la señalización del receptor TLR4 (Sarafi et al 1997). Esta quimiocina tiene alta afinidad con el receptor CCR2 humano, y ejerce respuestas quimiotácticas y de liberación de calcio similares a las inducidas por CCL2/MCP-1 humana (Sarafi et al., 1997).

En modelos murinos de arteriosclerosis e inflamación pulmonar, CCL2/MCP-1 y CCL12/MCP-5 muestra un papel sinérgico en cuanto a la atracción de macrófagos al tejido afectado (Luntgens et al., 2005; Qiu et al., 2001). Sin embargo, como se demostró en modelos de inflamación de glándulas salivales y lagrimales en el ratón (Blease et al., 2001; Akpek et al., 2004), de manera contraria a CCL2/MCP-1, CCL12/MCP-5 está involucrada en la polarización de la respuesta hacia Th1 (Akpek et al., 2004).

Un patrón similar de expresión de CCL2/MCP-1 y CCL12/MCP-5 a partir del día 5 de infección por *T. cruzi*, pudiese estar relacionado con la colaboración de estas quimiocinas en la atracción de macrófagos al tejido cardiaco durante el proceso inflamatorio agudo. Sin embargo, la posible contribución de CCL12/MCP-5 en el desarrollo de una respuesta tipo Th1 es regulada negativamente por un a alta expresión de CCL2/MCP-1 desde las primeras horas de la infección experimental, y por la reducción de la migración y supervivencia de células que portan el receptor CCR2.

La interacción de CCR5 por sus ligandos CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  y CCL5/RANTES, se ha propuesto que interviene en el desarrollo de la respuesta tipo Th1. Sin embargo la depleción de este receptor en ratones C57BL/6 (Sato et al., 2001) o el tratamiento *in vitro* de macrófagos con el antagonista Met-RANTES (Marino et al 2004 y 2005), demostró que la activación de CCR5 no es esencial para que la respuesta Th1 se lleve a cabo en diferentes modelos inflamatorios.

En particular durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas, el tratamiento con Met-RANTES redujo la inflamación en el miocardio por un menor reclutamiento de linfocitos T que expresan CCR5, no interviniendo con el montaje de una respuesta tipo Th1 protectora en el corazón de ratones infectados (Marino et al., 2004, 2005).

En el modelo de infección analizado en este trabajo, se observó un patrón de expresión de CCR5 similar al de CCR2 entre los días 10 y 20 de infección. Sin embargo, en el día 28 se observó un nuevo incremento en la expresión de este receptor significativamente mayor al observado en los 10 y 15 días.

En nuestro modelo experimental, el aumento en la expresión de CCL2/MCP-1 y probablemente de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\alpha$  y CCL5/RANTES en el miocardio, inducen la migración de macrófagos y linfocitos T que expresan CCR2 y CCR5 durante los 5 a 20 días de la infección. La migración diferencial de células CCR5 +, y no CCR2 + hacia el miocardio en el día 28 de infección, probablemente esté asociada con una expresión aumentada de los ligandos de CCR5 en el corazón en este tiempo de infección. Esta hipótesis debe ser probada mediante el análisis de la expresión en el miocardio de los ligandos del receptor CCR5 (CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES) en este modelo experimental.

Una vez en el corazón, los altos niveles de CCL2/MCP-1 activan, mediante la señalización de un receptor aún no identificado, la producción de IL-4 por los linfocitos T CCR5+ provocando un cambio en la respuesta adaptativa hacia el tipo Th2. De esta forma, la inflamación exacerbada en el tejido cardíaco de ratones BALB/c inoculados con la cepa Querétaro de *T. cruzi*, resultado de la migración predominante de macrófagos y linfocitos T que expresan CCR5, la polarización de la respuesta inmune hacia Th2 inducida por altos niveles de expresión de CCL2/MCP-1 y CCL12/MCP-5, y la reducción en el número de células CCR2+ infiltrantes, sería en parte responsable de que estos ratones no sobrevivan a la fase aguda de la enfermedad.

En este estudio también se analizó la expresión de la quimiocina CX3CL1/Fractalcina y su receptor CX<sub>3</sub>CR1. La alta expresión por las células endoteliales de este receptor y su ligando, al igual que CCL2/MCP-1 y CCR2, se ha involucrado en la progresión de la arteriosclerosis y síndromes coronarios agudos, dado a que CX3CL1/Fractalcina media la migración de macrófagos y linfocitos T activados a las placas arterioscleróticas (Lesnik et al., 2003).

A pesar de que se registra un incremento en la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 y CX3CL1/Fractalcina en corazón asociado a la infección por *T. cruzi*, este incremento, comparado con el de las otras quimiocinas analizadas, no difiere de los niveles basales en este tejido, por lo que no parece tener un papel importante durante las fases iniciales de la respuesta aguda durante la infección experimental por *T. cruzi*. Estudios mas detallados en diferentes fases de la infección experimental, contribuirían a esclarecer el papel de esta quimiocina y su receptor en esta parasitosis.

## **Conclusión.**

Los datos obtenidos a partir de este trabajo experimental, permitieron hacer inferencias sobre la participación de las quimiocinas CCL2/MCP-1 y CCL12/MCP-5, como su receptor CCR2, así como del receptor CCR5 en el desarrollo y la polarización de la respuesta inmune en el miocardio de ratones BALB/c inoculados con la cepa Querétaro de *T. cruzi*. El patrón de expresión de estas quimiocinas y receptores, mostró que la respuesta predominante en este tejido de los ratones infectados durante la fase aguda de la enfermedad es principalmente de tipo Th2, caracterizada por altos niveles de expresión de CCL2/MCP-1 y CCL12/MCP-5, una reducción en la migración de macrófagos CCR2+ inductores de respuesta Th1, y el aumento en la migración de linfocitos T CCR5+, que expresan altos niveles de IL-4. De esta forma, las quimiocinas y receptores analizados intervienen en la susceptibilidad de esta cepa de ratón a la infección por *T. cruzi*, que se ha descrito es incapaz de sobrevivir a la fase aguda de la enfermedad (Sosa-Aguilar, 2003).

Otras quimiocinas como CX3CR1 y su receptor, no se ha descrito su participación en el desarrollo de la respuesta inmune aguda ante la infección por la cepa Querétaro de *T. Cruzii*, por lo que un análisis más detallado permitirá describir su función en esta parasitosis.

Para un mejor entendimiento del proceso inflamatorio inducido por *T. cruzi* en tejido cardíaco, es necesario realizar un análisis más completo de la expresión y el papel funcional de las quimiocinas y receptores analizados en este estudio, así como de otras quimiocinas (Ej.: ligandos de CCR5), y citocinas como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-4, en el periodo tardío de la fase aguda, y durante la fase crónica de infección con la cepa Querétaro de *T. cruzi*.

## LITERATURA CITADA.

1. Abel, L.C., et al., *Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to Trypanosoma cruzi infection*. J Autoimmun, 2001. **17**(1): p. 99-107.
2. Abrahamsohn, I.A. and R.L. Coffman, *Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection*. Exp Parasitol, 1996. **84**(2): p. 231-44.
3. Akpek, E.K., et al., *Chemokines in autoimmune lacrimal gland disease in MRL/MpJ mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(1): p. 185-90.
4. Alberti, E., et al., *Specific cellular and humoral immune response in Balb/c mice immunised with an expression genomic library of Trypanosoma cruzi*. Vaccine, 1998. **16**(6): p. 608-12.
5. Aliberti, J.C., et al., *Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes*. Infect Immun, 1996. **64**(6): p. 1961-7.
6. Aliberti, J.C., et al., *beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with Trypanosoma cruzi*. Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4819-26.
7. Aliberti, J.C., 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. **158**(4): p. 1433-40.
8. Barr, S.C., et al., *Upregulation of cardiac cell plasma membrane calcium pump in a canine model of Chagas disease*. J Parasitol, 2003. **89**(2): p. 381-4.
9. Bartoli, C., et al., *CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies*. Acta Neuropathol (Berl), 2001. **102**(4): p. 385-92.
10. Belnoue, E., et al., *CCR5 deficiency decreases susceptibility to experimental cerebral malaria*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4253-9.
11. Blease, K., et al., *Antifungal and airway remodeling roles for murine monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 during pulmonary exposure to Asperigillus fumigatus conidia*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1832-42.
12. Bonecchi, R., et al., *Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s*. J Exp Med, 1998. **187**(1): p. 129-34.
13. Boring, L., et al., *Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice*. J Clin Invest, 1997. **100**(10): p. 2552-61.
14. Bosseno, M.F., et al., *Predominance of Trypanosoma cruzi lineage I in Mexico*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(2): p. 627-32.
15. Brenier-Pinchart, M.P., et al., *Chemokines in host-protozoan-parasite interactions*. Trends Parasitol, 2001. **17**(6): p. 292-6.

16. Brodskyn, C., et al., *Glycoinositolphospholipids from Trypanosoma cruzi interfere with macrophages and dendritic cell responses*. Infect Immun, 2002. **70**(7): p. 3736-43.
17. Burleigh, B.A. and A.M. Woolsey, *Cell signalling and Trypanosoma cruzi invasion*. Cell Microbiol, 2002. **4**(11): p. 701-11.
18. Bustamante, J.M., et al., *Trypanosoma cruzi reinfections provoke synergistic effect and cardiac beta-adrenergic receptors' dysfunction in the acute phase of experimental Chagas' disease*. Exp Parasitol, 2003. **103**(3-4): p. 136-42.
19. Caler, E.V., et al., *Dual role of signaling pathways leading to Ca(2+) and cyclic AMP elevation in host cell invasion by Trypanosoma cruzi*. Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 6602-10.
20. Caler, E.V., et al., *Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by Trypanosoma cruzi*. Embo J, 1998. **17**(17): p. 4975-86.
21. Calvet, C.M., et al., *Trypanosoma cruzi-cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo*. Exp Parasitol, 2004. **107**(1-2): p. 20-30.
22. Calvet, C.M., et al., *Heparan sulfate proteoglycans mediate the invasion of cardiomyocytes by Trypanosoma cruzi*. J Eukaryot Microbiol, 2003. **50**(2): p. 97-103.
23. Calzada, J.E., et al., *Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy*. Tissue Antigens, 2001. **58**(3): p. 154-8.
24. Campos, M.A. and R.T. Gazzinelli, *Trypanosoma cruzi and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors*. Mediators Inflamm, 2004. **13**(3): p. 139-43.
25. Cardillo, F., A. Nomizo, and J. Mengel, *The role of the thymus in modulating gammadelta T cell suppressor activity during experimental Trypanosoma cruzi infection*. Int Immunol, 1998. **10**(2): p. 107-16.
26. Cardillo, F., et al., *NK1.1 cells are required to control T cell hyperactivity during Trypanosoma cruzi infection*. Med Sci Monit, 2004. **10**(8): p. BR259-67.
27. Cascieri, M.A. and M.S. Springer, *The chemokine/chemokine-receptor family: potential and progress for therapeutic intervention*. Curr Opin Chem Biol, 2000. **4**(4): p. 420-7.
28. Charles, P.C., et al., *Cytokine, chemokine and chemokine receptor mRNA expression in different strains of normal mice: implications for establishment of a Th1/Th2 bias*. J Neuroimmunol, 1999. **100**(1-2): p. 64-73.
29. Chaussabel, D., et al., *Alteration of migration and maturation of dendritic cells and T-cell depletion in the course of experimental Trypanosoma cruzi infection*. Lab Invest, 2003. **83**(9): p. 1373-82.
30. Chen, L., et al., *Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions*. Eur J Immunol, 2001. **31**(1): p. 265-75.
31. Chensue, S.W., *Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 821-35, table of contents.
32. Coelho, P.S., et al., *Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from Trypanosoma cruzi trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(5): p. 837-44.

33. Cotta-de-Almeida, V., et al., *Trypanosoma cruzi* infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(9): p. 2439-48.
34. Cremaschi, G., et al., *Modulatory effects on myocardial physiology induced by an anti-Trypanosoma cruzi monoclonal antibody involve recognition of major antigenic epitopes from beta1-adrenergic and M2-muscarinic cholinergic receptors without requiring receptor cross-linking*. *J Neuroimmunol*, 2004. **153**(1-2): p. 99-107.
35. Daly, C. and B.J. Rollins, *Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies*. *Microcirculation*, 2003. **10**(3-4): p. 247-57.
36. Damas, J.K., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 enhances and interleukin-10 suppresses the production of inflammatory cytokines in adult rat cardiomyocytes*. *Basic Res Cardiol*, 2001. **96**(4): p. 345-52.
37. Damas, J.K., et al., *Myocardial expression of CC- and CXC-chemokines and their receptors in human end-stage heart failure*. *Cardiovasc Res*, 2000. **47**(4): p. 778-87.
38. De Arruda Hinds, L.B., et al., *Modulation of B-lymphocyte and NK cell activities by glycoinositolphospholipid purified from Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 1999. **67**(11): p. 6177-80.
39. dos Santos, P.V., 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. **3**(12): p. 971-84.
40. DosReis, G.A., *Cell-mediated immunity in experimental Trypanosoma cruzi infection*. *Parasitol Today*, 1997. **13**(9): p. 335-42.
41. DosReis, G.A., et al., *The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease*. *Trends Parasitol*, 2005. **21**(5): p. 237-43.
42. Duthie, M.S., et al., *During Trypanosoma cruzi infection CD1d-restricted NK T cells limit parasitemia and augment the antibody response to a glycoposphoinositol-modified surface protein*. *Infect Immun*, 2002. **70**(1): p. 36-48.
43. Engman, D.M. and J.S. Leon, *Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity*. *Acta Trop*, 2002. **81**(2): p. 123-32.
44. Espinoza, B., et al., *Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of Trypanosoma cruzi isolated from patients*. *Acta Trop*, 1998. **70**(1): p. 63-72.
45. Ferreira, V., et al., *Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts*. *Mol Immunol*, 2004. **40**(17): p. 1279-91.
46. Fichera, L.E., et al., *Intracellular growth of Trypanosoma cruzi in cardiac myocytes is inhibited by cytokine-induced nitric oxide release*. *Infect Immun*, 2004. **72**(1): p. 359-63.
47. Frantz, S., R.A. Kelly, and T. Bourcier, *Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 5197-203.
48. Frantz, S., et al., *Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium*. *J Clin Invest*, 1999. **104**(3): p. 271-80.

49. Garzoni, L.R., et al., *Characterization of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> responses in primary cultures of mouse cardiomyocytes induced by Trypanosoma cruzi trypomastigotes.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2003. **98**(4): p. 487-93.
50. Gazzinelli, R.T., et al., *Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa.* Braz J Med Biol Res, 1998. **31**(1): p. 89-104.
51. Giordanengo, L., et al., *Cruzipain, a major Trypanosoma cruzi antigen, conditions the host immune response in favor of parasite.* Eur J Immunol, 2002. **32**(4): p. 1003-11.
52. Gomes, J.A., et al., *Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response.* Infect Immun, 2003. **71**(3): p. 1185-93.
53. Goni, O., P. Alcaide, and M. Fresno, *Immunosuppression during acute Trypanosoma cruzi infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells.* Int Immunol, 2002. **14**(10): p. 1125-34.
54. Gorelik, G., et al., *Trypanosoma cruzi antigens down-regulate T lymphocyte proliferation by muscarinic cholinergic receptor-dependent release of PGE2.* Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam, 1998. **48**(3): p. 115-23.
55. Guzman-Bracho, C., *Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update.* Trends Parasitol, 2001. **17**(8): p. 372-6.
56. Hall, B.S., et al., *Cell-specific activation of nuclear factor-kappaB by the parasite Trypanosoma cruzi promotes resistance to intracellular infection.* Mol Biol Cell, 2000. **11**(1): p. 153-60.
57. Higuchi, M.D., 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. **56**(5): p. 485-9.
58. Higuchi Mde, L., et al., *Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process.* Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1993. **423**(3): p. 157-60.
59. Hoft, D.F. and C.S. Eickhoff, *Type 1 immunity provides optimal protection against both mucosal and systemic Trypanosoma cruzi challenges.* Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6715-25.
60. Huang, H., et al., *Activation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B in murine Chagasic myocarditis.* Infect Immun, 2003. **71**(5): p. 2859-67.
61. Imai, T., et al., *Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion.* Cell, 1997. **91**(4): p. 521-30.
62. Joensen, L., et al., *Trypanosoma cruzi antigen that interacts with the beta1-adrenergic receptor and modifies myocardial contractile activity.* Mol Biochem Parasitol, 2003. **127**(2): p. 169-77.
63. Johnson, Z., et al., *Chemokine inhibition--why, when, where, which and how?* Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 2): p. 366-77.
64. Krautz, G.M., J.C. Kissinger, and A.U. Krettli, *The targets of the lytic antibody response against Trypanosoma cruzi.* Parasitol Today, 2000. **16**(1): p. 31-4.
65. Kurihara, T., et al., *Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor.* J Exp Med, 1997. **186**(10): p. 1757-62.

66. Kuziel, W.A., et al., *Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(22): p. 12053-8.
67. Laing, K.J. and C.J. Secombes, *Chemokines*. Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 443-60.
68. Lannes-Vieira, J., *Trypanosoma cruzi-elicited CD8+ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation?* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2003. **98**(3): p. 299-304.
69. Leavey, J.K. and R.L. Tarleton, *Cutting edge: dysfunctional CD8+ T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic Trypanosoma cruzi infection*. J Immunol, 2003. **170**(5): p. 2264-8.
70. Lehmann, M.H., et al., *Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) gene expression in dilated cardiomyopathy*. Cytokine, 1998. **10**(10): p. 739-46.
71. Leon, J.S. and D.M. Engman, *The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease*. Front Biosci, 2003. **8**: p. e315-22.
72. Lesnik, P., C.A. Haskell, and I.F. Charo, *Decreased atherosclerosis in CX3CR1-/- mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis*. J Clin Invest, 2003. **111**(3): p. 333-40.
73. Lieke, T., et al., *NK cells contribute to the control of Trypanosoma cruzi infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms*. Infect Immun, 2004. **72**(12): p. 6817-25.
74. Liu, R., et al., *Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection*. Cell, 1996. **86**(3): p. 367-77.
75. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
76. Lopez Bergami, P., J. Scaglione, and M.J. Levin, *Antibodies against the carboxyl-terminal end of the Trypanosoma cruzi ribosomal P proteins are pathogenic*. Faseb J, 2001. **15**(14): p. 2602-12.
77. Lu, B., et al., *Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice*. J Exp Med, 1998. **187**(4): p. 601-8.
78. Lutgens, E., et al., *Gene profiling in atherosclerosis reveals a key role for small inducible cytokines: validation using a novel monocyte chemoattractant protein monoclonal antibody*. Circulation, 2005. **111**(25): p. 3443-52.
79. Macedo, A.M., et al., *Trypanosoma cruzi: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004. **99**(1): p. 1-12.
80. Machado, F.S., 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. **191**(4): p. 627-36.
81. Machado, F.S., et al., *Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity*. Circulation, 2000. **102**(24): p. 3003-8.
82. Mack, M., et al., *Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4697-704.

83. Marino, A.P., M.I. Azevedo, and J. Lannes-Vieira, *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. **98**(7): p. 945-52.
84. Marino, A.P., et al., *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of Trypanosoma cruzi-elicited myocarditis*. Circulation, 2004. **110**(11): p. 1443-9.
85. Marino, A.P., et al., *CC-chemokine receptors: a potential therapeutic target for Trypanosoma cruzi-elicited myocarditis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005. **100 Suppl 1**: p. 93-6.
86. Martin, D.L. and R.L. Tarleton, *Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent Trypanosoma cruzi infection*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1594-601.
87. Michailowsky, V., et al., *Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during Trypanosoma cruzi infection*. Am J Pathol, 2001. **159**(5): p. 1723-33.
88. Ming, M., M.E. Ewen, and M.E. Pereira, *Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway*. Cell, 1995. **82**(2): p. 287-96.
89. Miyahira, Y., et al., *Critical contribution of CD28-CD80/CD86 costimulatory pathway to protection from Trypanosoma cruzi infection*. Infect Immun, 2003. **71**(6): p. 3131-7.
90. Monteon, V.M., et al., *American trypanosomiasis: in situ and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model*. Exp Parasitol, 1996. **83**(3): p. 267-74.
91. Montes, C.L., et al., *Trypanosoma cruzi mitochondrial malate dehydrogenase triggers polyclonal B-cell activation*. Clin Exp Immunol, 2002. **127**(1): p. 27-36.
92. Moore-Lai, D. and E. Rowland, *Microarray data demonstrate that Trypanosoma cruzi downregulates the expression of apoptotic genes in BALB/c fibroblasts*. J Parasitol, 2004. **90**(4): p. 893-5.
93. Moser, B., et al., *Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control*. Trends Immunol, 2004. **25**(2): p. 75-84.
94. Mukherjee, S., et al., *Microarray analysis of changes in gene expression in a murine model of chronic chagasic cardiomyopathy*. Parasitol Res, 2003. **91**(3): p. 187-96.
95. Muller, U., et al., *IL-12-independent IFN-gamma production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18*. J Immunol, 2001. **167**(6): p. 3346-53.
96. Murdoch, C. and A. Finn, *Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3032-43.
97. Niess, J.H., et al. *CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance*. Science, 2005. **307**(5707): p. 254-8.
98. Oliveira, A.C., et al., *Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to Trypanosoma cruzi glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with T. cruzi*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5688-96.

99. Ouaiissi, A., et al., *The Trypanosoma cruzi Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection.* J Immunol, 2002. **168**(12): p. 6366-74.
100. Oyama, J., et al., *Nitric oxide, cell death, and heart failure.* Heart Fail Rev, 2002. **7**(4): p. 327-34.
101. Peters, W., M. Dupuis, and I.F. Charo, *A mechanism for the impaired IFN-gamma production in C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout mice: role of CCR2 in linking the innate and adaptive immune responses.* J Immunol, 2000. **165**(12): p. 7072-7.
102. Petersen, C.A. and B.A. Burleigh, *Role for interleukin-1 beta in Trypanosoma cruzi-induced cardiomyocyte hypertrophy.* Infect Immun, 2003. **71**(8): p. 4441-7.
103. Petray, P., et al., *Role of macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) in macrophage homing in the spleen and heart pathology during experimental infection with Trypanosoma cruzi.* Acta Trop, 2002. **83**(3): p. 205-11.
104. Planelles, L., et al., *Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by Trypanosoma cruzi in APCs from resistant or susceptible mice.* Clin Exp Immunol, 2003. **131**(1): p. 41-7.
105. Powell, M.R., et al., *Cytokine mRNA levels in the hearts of inbred mice that develop different degrees of cardiomyopathy during infection with Trypanosoma cruzi.* Parasite Immunol, 1998. **20**(10): p. 463-71.
106. Qiu, B., et al., *Chemokine expression dynamics in mycobacterial (type-1) and schistosomal (type-2) antigen-elicited pulmonary granuloma formation.* Am J Pathol, 2001. **158**(4): p. 1503-15.
107. Raport, C.J., et al., *The orphan G-protein-coupled receptor-encoding gene V28 is closely related to genes for chemokine receptors and is expressed in lymphoid and neural tissues.* Gene, 1995. **163**(2): p. 295-9.
108. Reis, D.D., 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. **48**(5): p. 637-44.
109. Reis, M.M., 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. **83**(2): p. 165-72.
110. Richmond, A., *Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(9): p. 664-74.
111. Rodrigues, M.M., M. Ribeiro, and S.B. Boscardin, *CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate Trypanosoma cruzi through a nitric oxide dependent mechanism.* Immunol Lett, 2000. **73**(1): p. 43-50.
112. Ropert, C., et al., *Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from Trypanosoma cruzi trypomastigotes.* Microbes Infect, 2002. **4**(9): p. 1015-25.
113. Rot, A. and U.H. von Andrian, *Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells.* Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 891-928.

114. Rottman, J.B., et al., *Cellular localization of the chemokine receptor CCR5. Correlation to cellular targets of HIV-1 infection.* Am J Pathol, 1997. **151**(5): p. 1341-51.
115. Samson, M., et al., *Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene.* Biochemistry, 1996. **35**(11): p. 3362-7.
116. Sarafi, M.N., et al., *Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1.* J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 99-109.
117. Sathler-Avelar, R., et al., *Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with Trypanosoma cruzi.* Scand J Immunol, 2003. **58**(6): p. 655-63.
118. Sato, N., et al., *CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the Leishmania major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation.* J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 205-18.
119. Scharfstein, J., et al., *Host cell invasion by Trypanosoma cruzi is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors,* in *J Exp Med.* 2000. p. 1289-300.
120. Soares, M.B., et al., *Balanced cytokine-producing pattern in mice immunized with an avirulent Trypanosoma cruzi.* An Acad Bras Cienc, 2003. **75**(2): p. 167-72.
121. Soares, M.B., L. Pontes-De-Carvalho, and R. Ribeiro-Dos-Santos, *The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet.* An Acad Bras Cienc, 2001. **73**(4): p. 547-59.
122. Soares, M.B. and R.R. Santos, *Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental Chagas disease.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 1999. **94 Suppl 1**: p. 257-62.
123. Sosa-Aguilar, S., *Respuesta Inmune contra cepas mexicanas de Trypanosoma cruzi.* 2003, UNAM. Facultad de Ciencias: México, DF.
124. Souza, P.E., et al., *Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity.* Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 5283-91.
125. Talvani, A., et al., *Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in Trypanosoma cruzi-infected murine macrophages and mediates resistance to infection.* Infect Immun, 2002. **70**(8): p. 4247-53.
126. Talvani, A., et al., *Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with Trypanosoma cruzi.* Microbes Infect, 2000. **2**(8): p. 851-66.
127. Talvani, A., et al., *Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy.* Clin Infect Dis, 2004. **38**(7): p. 943-50.
128. Talvani, A., et al., *Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in chagasic cardiomyopathy.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004. **99**(6): p. 645-9.
129. Talvani, A., et al., *Brain natriuretic peptide measurement in Chagas heart disease: marker of ventricular dysfunction and arrhythmia.* Int J Cardiol, 2005. **100**(3): p. 503-4.

130. Talvani, A., et al., *Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease*. J Infect Dis, 2004. **189**(2): p. 214-20.
131. Talvani, A., et al., *Experimental Trypanosoma cruzi infection in platelet-activating factor receptor-deficient mice*. Microbes Infect, 2003. **5**(9): p. 789-96.
132. Tarleton, R.L., M.J. Grusby, and L. Zhang, *Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with Trypanosoma cruzi*. J Immunol, 2000. **165**(3): p. 1520-5.
133. Tarzami, S.T., et al., *Chemokine expression in myocardial ischemia: MIP-2 dependent MCP-1 expression protects cardiomyocytes from cell death*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(2): p. 209-21.
134. Teixeira, M.M., R.T. Gazzinelli, and J.S. Silva, *Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection*. Trends Parasitol, 2002. **18**(6): p. 262-5.
135. Traynor, T.R., et al., *Differential roles of CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 in the development of T1 immunity*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4659-66.
136. Umekita, L.F. and I. Mota, *How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with T. cruzi?* Braz J Med Biol Res, 2000. **33**(3): p. 253-8.
137. Vaena de Avalos, S., et al., *Immediate/early response to Trypanosoma cruzi infection involves minimal modulation of host cell transcription*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 639-44.
138. Van Coillie, E., J. Van Damme, and G. Opdenakker, *The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines*. Cytokine Growth Factor Rev, 1999. **10**(1): p. 61-86.
139. Van Overtvelt, L., et al., *Trypanosoma cruzi infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules*. Infect Immun, 1999. **67**(8): p. 4033-40.
140. Villalta, F., et al., *The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide*. Infect Immun, 1998. **66**(10): p. 4690-5.
141. Voevoda, M.I., et al., *Association of the CCR2 chemokine receptor gene polymorphism with myocardial infarction*. Dokl Biol Sci, 2002. **385**: p. 367-70.
142. Zambrano-Villa, S., et al., *How protozoan parasites evade the immune response*. Trends Parasitol, 2002. **18**(6): p. 272-8.
143. Zuniga, E., et al., *Trypanosoma cruzi infection selectively renders parasite-specific IgG+ B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide*. J Immunol, 2002. **168**(8): p. 3965-73.