



Universidad de Buenos Aires – Facultad de Farmacia y Bioquímica

**Rol de las galectinas y sus glicanos en la fisiopatología de la célula cardíaca infectada con *Trypanosoma cruzi*. Implicancias en la cardiomiopatía chagásica crónica.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Tesista: Alejandro Francisco Benatar

Directora: Karina Andrea Gómez

Co-director: Gabriel Adrián Rabinovich.

Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas (LaBMECh) - Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular Dr. Héctor Torres - CONICET

Buenos Aires, 2015.

“Frente a las enfermedades que genera la miseria, frente a la tristeza, la angustia y el infortunio social de los pueblos, los microbios, como causas de enfermedad, son unas pobres causas.”

Ramón Carrillo.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a todas las personas que en mayor o menor medida, contribuyeron a que esta Tesis pudiera ser posible.

A mis directores, Karina Gómez y Gabriel Rabinovich. A Karina por estar desde el comienzo, primero como compañera del laboratorio y después como directora, por la sinceridad, por el debate de ideas, a veces efusivo, pero siempre con respeto, y por darme aliento.

A Gaby por su generosidad y su honestidad; por aparecer en las difíciles, y darme la posibilidad de empezar de cero, abriéndome las puertas de su laboratorio, y por demostrar que se puede ser un científico superlativo, sin dejar de ser una excelente persona, dejando sin argumentos a quienes piensan que para llegar lejos hay que pisar cabezas.

Quiero agradecerles tanto a Kari como a Gaby, por su dirección, planificación y análisis de experimentos, consejos, por su calidez en el trato personal, y por estar en las buenas, y en las malas, y porque, tras la muerte de Mariano Levin, me extendieron desinteresadamente su mano y me invitaron a creer que esta Tesis era posible. Sin su esencial ayuda, esta Tesis, hoy no existiría, y por tal motivo me gustaría dedicársela a ellos.

A Mariela Lanabere, que me banca incondicionalmente todos los días fuera del laboratorio, que entiende mis extravagantes horarios, y que me da su apoyo siempre. Por eso, también me gustaría dedicarle esta Tesis.

A los jurados de esta Tesis por la lectura y evaluación de este trabajo.

A Mariano Levin por haberme recibido en su laboratorio, y por las discusiones científicas.

A Mirtha Flawia y al “Doc” Héctor Torres por haberme permitido trabajar en el instituto.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas (LaBMECh), por los almuerzos y la excelente onda, por festejar en las buenas con tortas, y por sus consejos, que facilitaron los experimentos. Además de lo anteriormente dicho, quería agradecer a Leandro Simonetti por su buen humor, el cálido recibimiento en las primeras etapas en el LaBMECh, y por la invaluable ayuda. A Laura Tasso por los ricos mates y por todo lo que me enseñó sobre cultivos celulares. A Juan Carlos Ramírez Gómez (el fundamentalista del aire acondicionado), por su ayuda con las PCRs en la etapa de Tesis, y en esta nueva etapa en el laboratorio. A “la chiqui” Natalia Juiz por contestarme pacientemente

cuando le preguntaba por los métodos estadísticos a utilizar en los experimentos, y por compartir momentos de escritura. A Gonzalo Acevedo por su ayuda con los gráficos, su forma de ser, y por recordarme que tengo que escribir la Tesis. A Carolina Cura por la genotipificación de los parásitos y por ser una excelente compañera. A Alejandro Schijman por sus consejos sobre PCRs y por haberme aceptado en el laboratorio, tras la muerte de Mariano, y en esta nueva etapa. A Susana Besuschio por su capacidad multitarea, sin la cual me marearía. A Silvia Longhi por los sueros y su infalible capacidad para suprimir frases y convertir textos al número de palabras deseadas. Y a todos ellos por hacer un ambiente genial de trabajo.

A los miembros del laboratorio de Inmunopatología del IByME, por haberme abierto las puertas, y brindado su ayuda, y consejos. A Marta Toscano por ayudarme con el análisis de los resultados, y a usar el Illustrator y por las charlas sobre plantas. Al “Pela” Juan Pablo Cerliani y a Diego Croci por la producción de las cantidades industriales de Galectina-1 recombinante que utilicé en los experimentos. A Juan Carlos Stupirsky por darme una mano con los ELISAS de Gal-1. Al “Tucu” Marcos Barbosa, Tomás Daloto, Santiago Méndez Huergo, Verónica Martínez Allo, Iván Mascanfroni y a Sebastián Dergan-Dyllon por las miles de células que me ayudaron a pasar por el Citómetro de Flujo. A Mariana Salatino, por enseñarme a hacer las RT-qPCRs de galectina-1. A Karina Mariño por sus conocimientos sobre glicobiología. A Claudia Gatto por los ratones *Lgals1<sup>-/-</sup>* que luego formaron la colonia en el bioterio del Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén. A ellos, y al resto de la gente del laboratorio por la buena onda que tuvieron siempre.

A los miembros del Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén, es decir a los “Fataleros”. A Gabriela García por sus consejos, por su ayuda con la gran mayoría de los experimentos y su provisión constante de tripomastigotes. A Jacqueline Búa por su invaluable participación en el armado y la realización de los experimentos con ratones. A Miriam Postan por el análisis de los cortes histológicos de los animales, así como a su becaria, Lupi por ayudarme a tomar las fotos. A Andrea Bruballa por el cultivo de parásitos. A Maximiliano Ferrero por el protocolo de Inmunofluorescencia de células infectadas. A Mónica Esteva por el suero de ratones infectados, que usé como anticuerpo primario, por los parásitos y porque como jefa del departamento de investigación, me permitió hacer experimentos en el Instituto. A Laura Fichera por los parásitos de la cepa Brazil. A la gente del bioterio, Marta Gabi y Gabriela Barja que mantuvieron las colonias de animales utilizadas en este trabajo de Tesis. Al Fatala en general, porque gracias a la suerte, usualmente tenía la

puntería de caer en el Instituto en el exacto momento en el que había algún festejo, y siempre me invitaban.

A Jorge Scaglione, del Hospital de Niños Pedro Elizalde por el análisis de los electrocardiogramas de ratones, y su buena predisposición.

A los Taluíneros por ser un cable a tierra.

Al INGEBI en general, por compartir, mesadas, pasillos, almuerzos, charlas e instituto, durante estos años y contribuir a un gran ambiente de trabajo. Entre ellos quiero agradecer a Franco (miembro adoptivo del LaBMECh), Francisco, Matías, Javier, Sonia, Leandro, Alejandro “samurái” Cinalli, Alejandra Prost, Flor, Kika, Mile, “Ramachandrán”, María, Mauro, Santi, Briardo, Adolfo Iribarren, Ana, Cata, Manu, Lara, David, Rafi.

A los que pasaron por el LaBMECh y que ya no están pero que compartieron el laboratorio, aportando ideas, una mano y/o buena onda durante parte del doctorado, como Juan Burgos, Tomás Duffy, Gabriela Levy, Joaquín Basile, Martín Edreira, Juan “Juanelo” Zárata y Gustavo Saldaña.

A Rubén y toda la gente de mantenimiento por encontrar siempre la forma de arreglar (aunque sea con alambres) los equipos que inoportunamente se rompían antes de un experimento importante. A Norma y a Gladis por tener siempre listo el material a utilizar. A Marta Garibaldi, Daniel Gracia y toda la gente de administración por sacarnos de encima a proveedores, y poder enfocarnos en los experimentos.

A todos los que apoyaron desde otros ámbitos pero que también fueron importantes durante estos años de Tesis. A mi familia: a mi vieja, a mi viejo, a Gabriel, Cami, Marta, Memé, a Raquel y a Tata (que se quedaron en el camino pero siempre están), Jorge; a mis amigos de toda la vida: en especial a Julián, Damián, Nacho, Pablo, Hernán, Alejandro

A mis vecinos, “Unidos por el Río” por defender los lugares a los que voy a recargar pilas en las malas, y también en las buenas, que son el río, el bosquecito y la reserva ecológica de Vicente López, y por enseñarme a debatir ideas sin perder la humildad y el respeto.

**¡¡Gracias Totales!!**

## **Índice**

Agradecimientos .....	1
Índice.....	4
Resumen.....	6
Introducción .....	8
La enfermedad de Chagas-Mazza .....	8
Agente etiológico y estadios de la enfermedad de Chagas-Mazza .....	10
Formas de Transmisión y vectores .....	13
Ciclo de vida .....	17
Variabilidad genética y linajes.....	23
Etapas de la enfermedad de Chagas-Mazza.....	24
Cardiomiopatía chagásica crónica y patogénesis de la enfermedad .....	26
Tratamiento .....	28
Infección en animales y modelo experimental.....	29
Glicanos y lectinas .....	31
Galectinas.....	35
Galectina-1 .....	39
Galectina-1 y enfermedades infecciosas .....	41
Hipótesis y objetivos:.....	44
Materiales y Métodos.....	45
Resultados .....	68
Determinación de la concentración de Gal-1 en suero de pacientes con Enfermedad de Chagas-Mazza crónica .....	68
Expresión de Gal-1 en células HL-1 .....	69
Efecto de Gal-1 sobre el curso de la infección por <i>T. cruzi</i> en células HL-1 .....	76

---

Efecto de Gal-1 sobre la apoptosis de células HL-1 infectadas con <i>T. cruzi</i> .....	84
Glicofenotipo de células infectadas .....	87
Efecto de Gal-1 sobre la infección experimental <i>in vivo</i> en modelos murinos.....	94
Discusión.....	107
Bibliografía .....	116
Abreviaturas.....	135

## **Resumen**

La cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) es una de las manifestaciones más graves de etapa crónica de la Enfermedad de Chagas-Mazza. Actualmente, se postulan dos hipótesis para explicar la patología cardíaca: la persistencia del parásito en el tejido cardíaco, y la respuesta inmune desarrollada especialmente contra antígenos propios. Si bien la patología de la CCC es multifactorial, está claro que la presencia de diferentes linajes del parásito, así como los componentes del sistema inmune del hospedador, determina el progreso de la forma asintomática de la enfermedad a la CCC.

Mediante su interacción con los glicanos presentes en distintas glicoproteínas, Galectina-1 (Gal-1) participa en la regulación de diversos fenómenos inmunológicos, y además modula la actividad microbicida y la supervivencia de macrófagos infectados por *T. cruzi*.

En este marco, el objetivo general de este trabajo de Tesis fue evaluar los cambios que se producen en los cardiomiocitos a nivel de galectinas, y de los glicanos presentes en la superficie celular ante la infección por *T. cruzi* con el propósito de profundizar en la implicancia de estos factores en la aparición de la patología cardíaca desarrollada en los pacientes con CCC.

Los resultados presentados en esta Tesis, indican que Gal-1 posee efectos protectores sobre cultivos de células cardíacas de la línea HL-1, infectadas con dos cepas de *T. cruzi*, pertenecientes a dos Unidades Discretas de Tipificación (UDT) diferentes, Tulahuén (UDT VI) y Brazil (UDT I). Estos efectos fueron independientes de la unión de Gal-1 a la superficie de tripomastigotes, y resultaron en un porcentaje menor de células infectadas con *T. cruzi*, así como también en una disminución del grado de apoptosis generado por el parásito.

En ratones deficientes para el gen de Gal-1 (*Lgals1<sup>-/-</sup>*), se observaron mayores niveles de parasitemias para ambas cepas de *T. cruzi* respecto de animales C57Bl/6 *wild-type* durante el primer mes de infección. Estos animales transgénicos también presentaron mayor parasitismo en músculo cardíaco, y en el caso de las hembras, una menor respuesta inflamatoria en corazón y una mayor susceptibilidad a la infección con la cepa Tulahuén.

Los ratones infectados con la cepa Brazil no presentaron nidos de amastigotes, y muy pocos infiltrados inflamatorios en los preparados histológicos, y las alteraciones en sus

electrocardiogramas a los 35 y a los 95 días post infección, no presentaron un patrón diferencial entre ratones transgénicos y *wild-type*.

Por otra parte, ambas cepas de *T. cruzi* evaluadas, lograron modificar el patrón de glicanos de superficie de la célula HL-1. Mientras que la infección de las células con tripomastigotes de la cepa Tulahuén, indujo la aparición de un glicofenotipo menos permisivo para la unión de Gal-1, el cambio en el patrón de glicoconjugados fue muchos más leve al infectar con la cepa Brazil. La infección no indujo cambios en la expresión de Gal-1 en células HL-1, aunque sí se generó un incremento de su concentración en sobrenadantes de cultivo. Al ser un marcador de daño cardíaco, también se analizó la expresión de Gal-3 en células HL-1, la cual reveló un incremento en células infectadas con la cepa Brazil.

Estos datos sugieren que Gal-1 tendría un rol protector en las primeras etapas de la infección por *T. cruzi*, y que la capacidad del parásito para modificar el glicofenotipo de la célula cardíaca hospedadora, modularía estos efectos, disminuyendo el efecto de esta lectina en la Enfermedad de Chagas-Mazza.

## **Introducción**

### **La enfermedad de Chagas-Mazza**

La enfermedad de Chagas-Mazza, causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, es una de las principales enfermedades endémicas en América Latina afectando, según datos estimativos, a más de 15 millones de personas y provocando unas 20.000 muertes por año (WHO 2007; Rodrigues Coura y col. 2009). La enfermedad está presente en el continente americano desde hace mucho tiempo, como se desprende del hecho que existen evidencias de casos en humanos que datan de hace más de 4.000 años (Guhl y col. 1999; Aufderheide y col. 2004). Sin embargo, actualmente la enfermedad no está circunscripta a Latinoamérica, debido a que en los últimos años existen cada vez más casos documentados de enfermedad de Chagas-Mazza congénita y de enfermos crónicos en Norteamérica, Europa, Japón y Australia, debido a la migración de personas infectadas desde países endémicos (Schmunis y col. 2007).

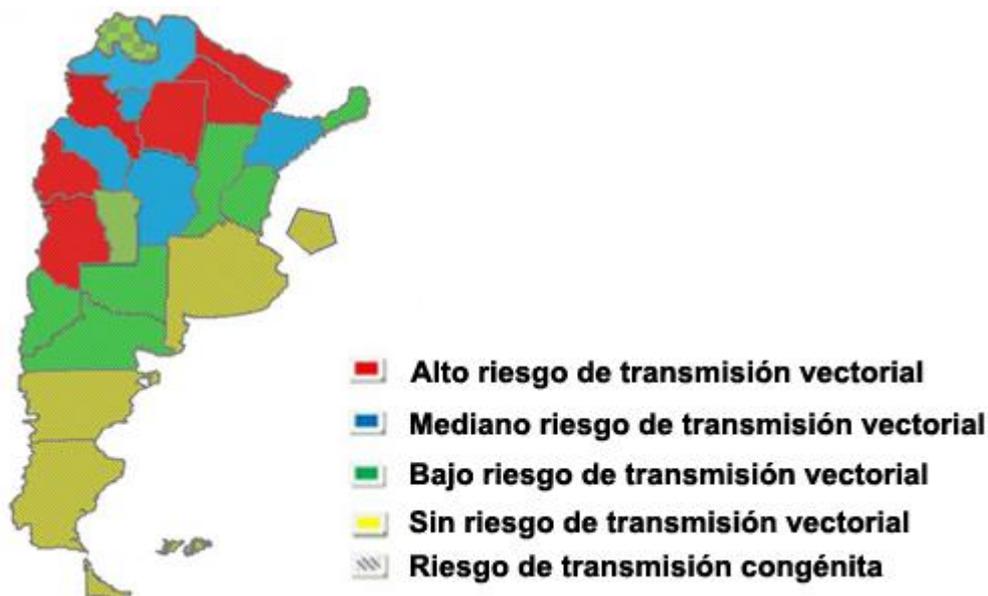


Figura 1. Mapa indicativo del riesgo de transmisión vectorial en nuestro país. Fuente: Ministerio de Salud de la Nación. <http://www.msal.gov.ar/chagas/index.php/informacion-para-ciudadanos/el-chagas-en-el-pais-y-america-latina>

En nuestro país, según datos del Ministerio de Salud se calcula que existen alrededor de 1,6 millones de personas infectadas, siendo las provincias de Chaco, Formosa, Catamarca, Santiago del Estero, Mendoza y San Juan, las provincias con mayor riesgo de transmisión vectorial (Figura 1). Sin embargo, este número de habitantes infectados es sólo estimativo, ya que desde el año 1993, año en que se interrumpió el servicio militar obligatorio, no existen datos que reflejen de forma confiable la incidencia de infectados en todo el territorio, puesto que una buena parte de los datos provenían de esta fuente (Zabala, 2009). No obstante, este hecho se ve parcialmente compensado con la existencia de muchos trabajos epidemiológicos que aportan datos muy confiables, aunque no de manera global, sino dentro de regiones más acotadas.

Dentro de una misma provincia se presentan zonas de más baja prevalencia, y otras en donde puede haber más de un 60% de la población infectada con *T. cruzi*, tal es el caso de distintas localidades habitadas por personas de la etnia qom y/o descendientes de españoles en la región de El Impenetrable, Chaco, o de las Lomitas, Provincia de Formosa. En este último caso, Sosa-Estani y col. establecieron en un estudio poblacional que la prevalencia de infección para el año 2009, en comunidades de la etnia wichí y pilagá, casi duplicaba a la media provincial, siendo de 17,5 *versus* 9,0%, respectivamente (Biancardi y col. 2003; Sosa-Estani y col. 2009).

La enfermedad de Chagas-Mazza es un problema social que desenmascara múltiples problemas de nuestro país. En primer lugar, la precariedad habitacional que lleva a muchísimas personas de bajos recursos, en áreas endémicas, a vivir en las denominadas “casas rancho”, con paredes de adobe y techos de paja, que son un lugar inmejorable para que proliferen vinchucas domésticas, responsables de la transmisión domiciliar de esta enfermedad. Por otro lado, también desnuda fallas en las políticas sanitarias, como interrupciones súbitas de los programas de control vectorial por reasignación del presupuesto ante hechos fortuitos. Uno de esos casos fue el de la epidemia de dengue ocurrido en 2009, donde según relata Gürtler (2009), se interrumpieron todas las acciones tendientes al control de triatomíneos. Otro tipo de fallas en el sistema sanitario involucran el desconocimiento de las costumbres culturales de las poblaciones originarias. En un trabajo de Dell'Arciprete y col. (2014) se analiza esta situación, y se destaca que para el caso estudiado, los programas de fumigación de viviendas no tuvieron en cuenta que los pobladores de las etnias wichí y pilagá, tienen normas culturales que los hacen estar fuera de sus viviendas por tiempos variables. Este hecho disminuyó la efectividad de los poco flexibles, esquemas de

fumigación, por no encontrar a los habitantes de las viviendas durante la visita. Esta situación se ve agravada por una inadecuada comunicación médico-paciente debido al uso de un lenguaje preferentemente científico en vez de coloquial para explicar a la comunidad los problemas relacionados a esta enfermedad (Dell'Arciprete y col. 2014).

De la misma manera que ocurre en otras enfermedades transmitidas por vectores, como leishmaniasis, malaria, filariosis, la deforestación y colonización humana de selvas y bosques, constituye un factor de riesgo en la adquisición de la enfermedad de Chagas-Mazza (Briceño-Leon, 2007; Fernández y col. 2011; Colwell y col. 2011). La principal razón de este hecho radica en que la fragmentación de los ambientes naturales disminuye la disponibilidad de animales salvajes, que sirven de alimento para los triatomíneos vectores, lo que los lleva a colonizar viviendas. Pero a su vez, se seleccionan especies más adaptadas a ambientes degradados como comadrejas y roedores, que son mejores transmisores de la enfermedad y que van a buscar comida más cerca de espacios peridomiciliarios (Roque y col. 2008; Gürtler 2009; Rodrigues Coura y col. 2012; Das Chagas Xavier y col. 2012).

### Agente etiológico y estadíos de la enfermedad de Chagas-Mazza

El microorganismo responsable de la enfermedad de Chagas-Mazza es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, el cual presenta un ciclo de vida complejo, en el que intervienen dos hospedadores, uno mamífero y otro, un insecto triatomíneo, al que comúnmente se denomina vinchuca. Para poder adaptarse a los diferentes microambientes de sus hospedadores, el parásito experimenta transformaciones biológicas, que se reflejan en cambios metabólicos y estructurales. Así, *T. cruzi* posee tres formas morfológicas diferentes: epimastigote, tripomastigote y amastigote.

Epimastigote: mide aproximadamente 20-40  $\mu\text{m}$  de longitud. En este estadío, el kinetoplasto se ubica en posición anterior respecto del núcleo, al igual que el bolsillo flagelar, por lo que presenta una membrana ondulante corta (Figura 2).

Esta es la forma replicativa que está presente en el estómago, intestino y en menor medida, en recto del triatomíneo vector. De los parásitos liberados en las heces del insecto, sólo una pequeña proporción serán epimastigotes que no lograron transformarse a tripomastigotes al pasar por la ampolla rectal. Dichas formas carecerán de capacidad infectiva (García y col. 2010).

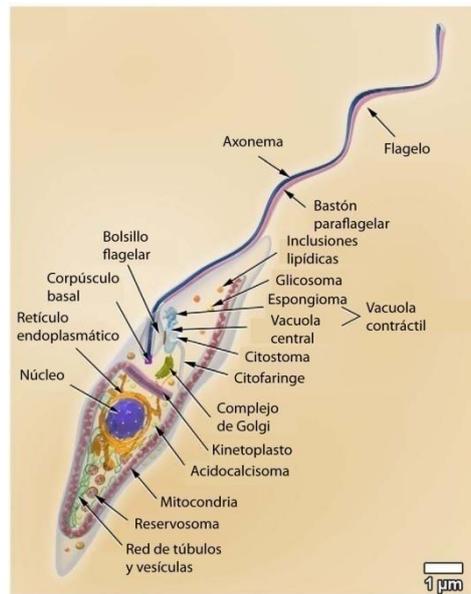


Figura 2. Esquema de un epimastigote con todas sus estructuras. Tomada de Teixeira y col. (2012)

Tripomastigote: mide alrededor de 25  $\mu\text{m}$  de largo, con un diámetro de unos 2  $\mu\text{m}$ . El kinetoplasto se localiza de forma posterior al núcleo, al igual que el bolsillo flagelar, lo que genera una membrana ondulante amplia (Figura 3).

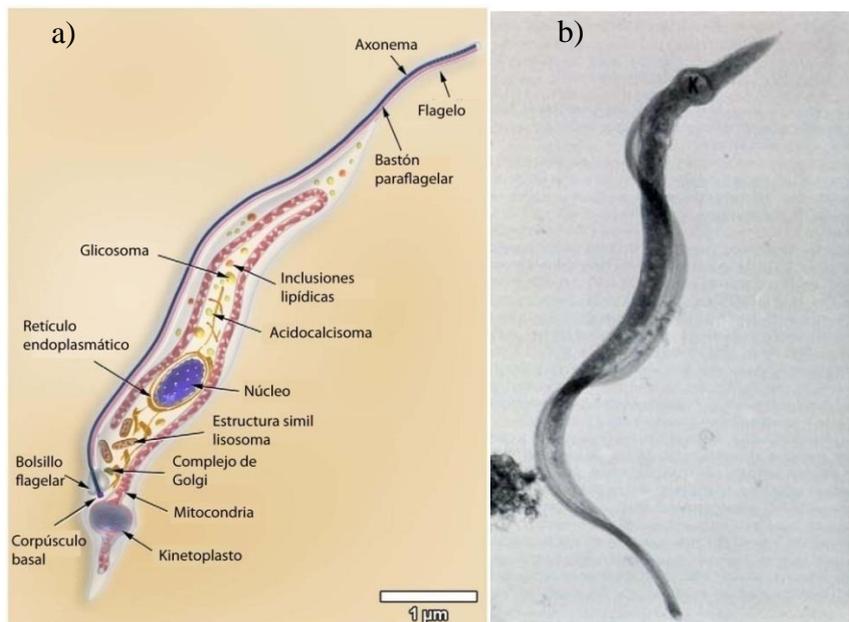


Figura 3. a) Esquema de un tripomastigote con todas sus estructuras. Figura tomada de Teixeira y col. 2012. b) Microfotografía electrónica de un tripomastigote de cultivo. El kinetoplasto está marcado con una letra K. Figura tomada de De Souza (2002)

Es la forma infectiva, no replicativa que se encuentra en el torrente sanguíneo de animales infectados o en sus tejidos (tripomastigote sanguíneo), y en heces e intestino posterior del vector invertebrado (tripomastigote metacíclico).

Las diferencias entre los tripomastigotes sanguíneos y los metacíclicos están relacionadas con la expresión de determinados genes, así como con la etapa del ciclo celular en la que se encuentran. Además, existen variaciones en sus moléculas de superficie y su capacidad infectiva, que justifican su clasificación como formas fisiológicamente diferentes del ciclo (Tyler y col. 2001). A su vez, dentro de los tripomastigotes sanguíneos se distinguen dos formas (Figura 4), una forma esbelta (*slender form*) y una forma ancha (*broad form*) (Tyler y col. 2001; García y col. 2010).

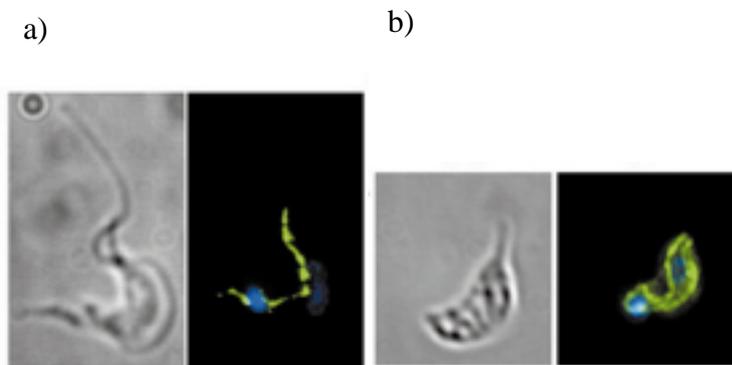


Figura 4. Microscopía de interferencia diferencial (DIC) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de la forma esbelta (a) y ancha (b) de tripomastigotes sanguíneos. En verde se puede observar el condrioma y en azul el núcleo. Figura tomada de Tyler y col. (2001)

Amastigote: posee un tamaño menor que las otras formas, es redondeado y presenta un flagelo muy corto, casi ausente (Figura 5). Se encuentra en el interior de la célula del hospedador mamífero, en donde se replica. Mantiene la capacidad de infectar células de vertebrados (De Souza 2002).

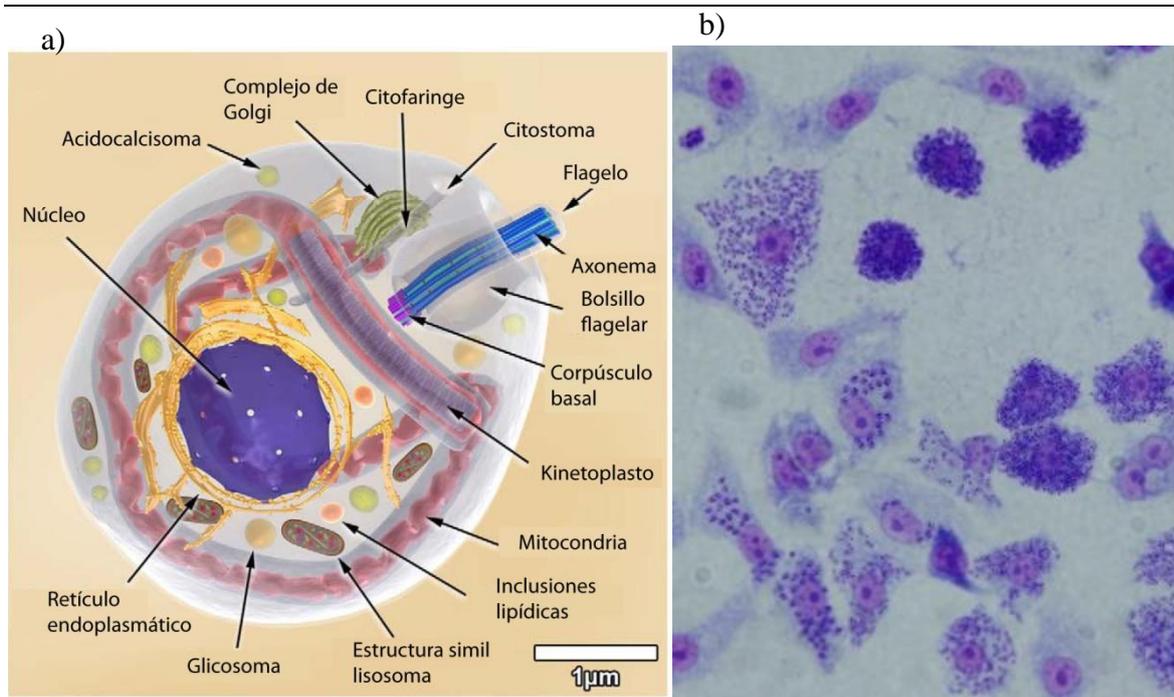


Figura 5. a) Esquema de un amastigote con todas sus estructuras. Figura tomada de Teixeira y col. (2012); b) Células cardíacas de la línea HL-1 infectadas con *T. cruzi*, teñidas con la coloración de Giemsa; visualización al microscopio óptico (400X). Puede observarse un elevado número de amastigotes por célula.

Algunos autores describen otra forma intermedia, pero que no sería un estadio en sí, llamado esferomastigote, que es replicativo y similar a los amastigotes, aunque con un flagelo más largo. Se produce en bajo número en el estómago de la vinchuca, derivan de tripomastigotes sanguíneos, y se encuentran en mayor número bajo condiciones de estrés (Tyler y col. 2001; De Souza y col. 2010; García y col. 2010).

### Formas de Transmisión y vectores

Las vías a través de las cuales *T. cruzi* puede ingresar al hospedador vertebrado son las siguientes:

- Vectorial
- Sanguínea
- Congénita (transplacentaria o adquirida en el pasaje durante el canal de parto)
- Oral
- Transplantes

Históricamente, la transmisión vectorial, fue y sigue siendo la vía más importante en zonas endémicas. Se pueden distinguir tres ciclos dentro de esta vía, el ciclo doméstico, el ciclo salvaje y el ciclo peridoméstico.

El ciclo doméstico se produce dentro del domicilio, involucra a vectores adaptados a vivir en ambientes humanos, y es el hombre el principal reservorio del parásito junto con perros y gatos. La especie más importante a nivel epidemiológico y el principal vector de este ciclo es *Triatoma infestans*, responsable de dos tercios de los casos de transmisión de la enfermedad de Chagas-Mazza en Latinoamérica, debido a su elevada distribución y gran adaptación para vivir en ambientes domiciliarios (Cardinal y col. 2008; Gurtler 2009; Pérez de Rosas y col. 2011).

Otros vectores domiciliarios de importancia en el continente son *Rhodnius prolixus* en Colombia, Venezuela y Centroamérica, y *Triatoma dimidiata* desde México hasta el norte de Sudamérica. Otras especies secundarias son *T. brasiliensis*, *T. barberi* y *Panstrongilus megistus*, que pueden colonizar viviendas en ausencia de una especie primaria (Noireau y col. 2009). En la Figura 6 se ilustra el mapa de los principales triatomíneos en América y las iniciativas de los distintos grupos de países para su control.

El ciclo selvático existe y se viene manteniendo desde hace millones de años, y está circunscripto al interior de la selva, donde tanto los vectores, como sus reservorios son animales silvestres, principalmente marsupiales como las comadreas del género *Didelphis*, así como otros mamíferos tales como roedores, armadillos, murciélagos y zorrinos. (Noireau y col. 2009; Rodrigues Coura y col. 2009; Lopes Rocha y col. 2013).

La transmisión transfusional es una de las principales vías de transmisión de la enfermedad en países no endémicos, tales como EEUU, Canadá, España, otros países de Europa, Australia, así como en países endémicos en los que no se han implementado controles de la enfermedad en los bancos de sangre, en los que puede constituir más del 20% de los casos de la enfermedad de Chagas-Mazza. En la mayoría de los países endémicos, el control serológico de donantes ha tenido éxito, disminuyendo ampliamente este tipo de transmisión (Schmunis y col. 2005; Schmunis, 2007; Rodrigues Coura y col. 2009).

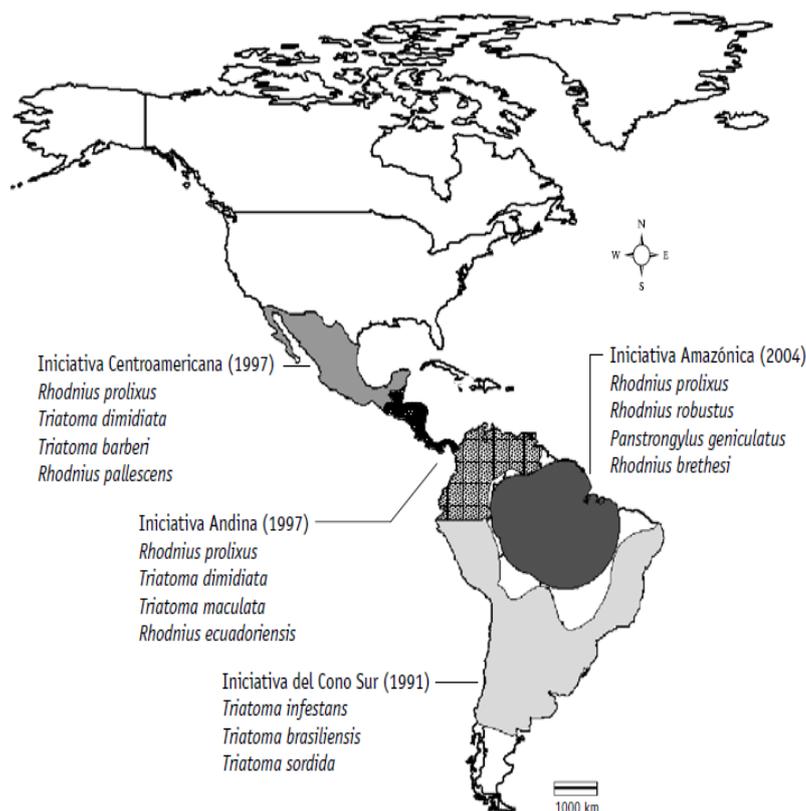


Figura 6. Mapa de distribución de los triatomíneos en América y las iniciativas de los distintos grupos de países para su control. Tomada de WHO (2007).

Actualmente y debido a las estrategias de control vectorial y transfusional, la vía congénita se ha vuelto de mayor importancia, tanto en zonas endémicas como no endémicas. Se han descrito muchos factores que determinan que una madre infectada pueda transmitir la enfermedad a sus hijos, entre ellos la cepa de *T. cruzi* circulante, la parasitemia materna, el periodo gestacional, el estado inmunológico de la madre, la región geográfica y la existencia de lesiones en la placenta. Los últimos informes de la OMS estiman un riesgo de transmisión promedio de la madre infectada al hijo recién nacido en un 5% de los embarazos, aunque variando entre un 1 a un 12% (Sánchez Negrete y col. 2005; Schmunis, 2007; WHO 2007; De Risio y col. 2010; Brutus y col. 2010).

En los últimos años, la vía de transmisión oral despertó un interés mayor en la comunidad científica, por la aparición de brotes en Brasil, Colombia y Venezuela. Es la forma de transmisión más importante en la región amazónica (Rodrigues Coura y col. 2012), y se origina por el consumo de frutas o jugos (sobre todo açaí, caña y guayaba), contaminados con

vinchucas, orina, o heces de animales (triatomíneos o marsupiales) en los que están presentes tripomastigotes de *T. cruzi* (Rodrigues Coura y col. 2009; Toso y col. 2011; Suárez y col. 2012). La ingesta de carne contaminada mal cocida, también es una forma de adquirir la enfermedad (Toso y col. 2011; Alvarado-Otegui y col. 2012.)

La transmisión de la enfermedad a través de trasplantes de órganos es de menor importancia que las anteriormente mencionadas, ya que existe un seguimiento y un protocolo de estudios previos a la operación, que definen si un órgano puede ser transplantado. Como en muchos casos el no transplantar llevaría a la muerte del paciente, y ante los largos períodos en lista de espera, puede priorizarse la realización del trasplante desde un donante infectado, por sobre la espera de un órgano sano. En dichos casos se administrará un tratamiento con drogas antiparasitarias, al donante por 10 días para disminuir la carga parasitaria, y un tratamiento profiláctico al receptor (Rodrigues Coura y col. 2009). Para el caso del trasplante cardíaco, sólo está recomendada esta práctica cuando el corazón proviene de un donante no infectado (WHO 2002).

## Ciclo de vida

El ciclo comienza cuando el insecto vector se alimenta con la sangre de un mamífero infectado con *T. cruzi* (Figura 7). En ese momento, el triatomíneo ingiere tripomastigotes sanguíneos, que llegan al estómago distensible del vector, donde son lisados casi en su totalidad (De Souza y col. 2010).



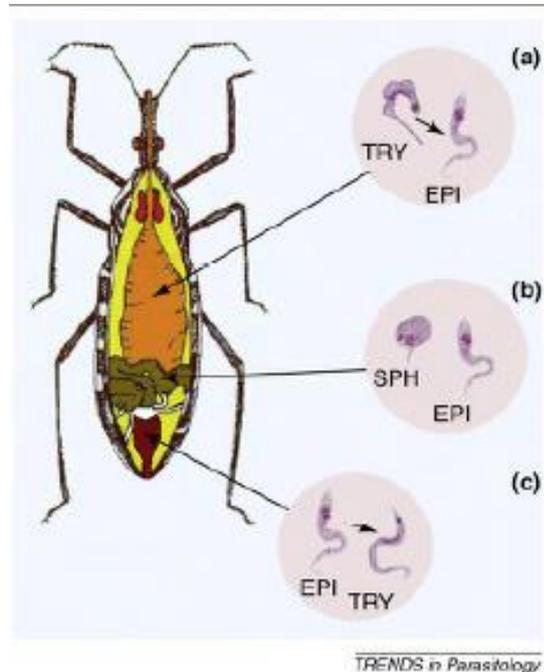
Figura 7. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Figura tomada de Abad-Franch y col. (2002)

Los parásitos sobrevivientes se transforman, en una pequeña proporción, en esferomastigotes y en su mayoría en epimastigotes (Figura 8a). Estas formas migran al intestino delgado y empiezan a dividirse por fisión binaria (Figura 8b) (García y col. 2010). Luego, se adhieren a las membranas peri-microvillares intestinales, y se activan señales que serían importantes en el inicio de la metacicloogénesis, en un proceso regulado por glicoconjugados de dicha membrana, y su interacción con glicoinositolfosfolípidos del parásito (De Souza y col. 2010). Alrededor de 3 a 4 semanas después, tiene lugar el pasaje a la ampolla rectal de la vinchuca (Figura 8c), y se produce la metacicloogénesis, con la consiguiente formación de tripomastigotes metacíclicos, que serán liberados en las heces y orina del insecto vector cuando éste se alimente nuevamente (De Souza y col. 2010; García y col. 2010). En su paso por el intestino, las mucinas (estructuras con una matriz proteica y un altísimo grado de O-glicosilación) de la superficie de *T. cruzi* tendrían un papel fundamental en la protección del

parásito contra proteasas y aglutininas presentes en el tracto digestivo del insecto vector, principalmente en la etapa de epimastigote (Buscaglia y col. 2006; Villata y col. 2008).

Figura 8. Ciclo de vida de *T. cruzi* en el insecto vector. Se observan las zonas más importantes del aparato digestivo, y las formas presentes en cada una de ellas:

- a) estómago;
- b) intestino delgado;
- c) recto.



Los tripomastigotes metacíclicos tienen una alta capacidad infectiva, aunque no presentan la capacidad de penetrar la piel intacta (Giddings y col. 2010). Para ingresar en el torrente sanguíneo del hospedador, deben ser arrastrados mecánicamente al sitio de la picadura mediante el rascado, o penetrar vía mucosas, ya sea conjuntiva, mucosa oral o respiratoria.

Una vez que ingresaron al organismo de su hospedador, los tripomastigotes metacíclicos infectarán diversos tipos celulares como macrófagos y fibroblastos, entre otros, para luego invadir principalmente células del músculo esquelético, liso y cardíaco. *T. cruzi* ha desarrollado diversos mecanismos complejos y redundantes que le permiten asegurar que el proceso de invasión ocurra de manera efectiva y eficiente (Epting y col. 2010). Sin embargo, la invasión celular es un proceso que varía de acuerdo a diferentes factores tales como el linaje, la forma celular parasitaria y el tipo de célula hospedadora, entre otros (de Souza y col. 2010). Hoy, se conocen diferentes glicoproteínas de la superficie con propiedades de adhesión celular que se expresan en el tripomastigote metacíclico tales como gp90, gp82, gp30 y gp35/50, y que son diferencialmente expresadas en las diferentes cepas, mediando vías de señalización que pueden resultar o no en la internalización eficiente del parásito

(Yoshida 2006; Alves y col. 2007; Villata y col. 2008; Calvet y col. 2012). Las mucinas presentes en la superficie de *T. cruzi*, al igual que la cruzipína y las trans-sialidasas, estarían implicadas no sólo en la adhesión, sino también en el proceso de invasión (Buscaglia y col. 2006; De Souza y col. 2010; Calvet y col. 2012; Bartholomeu y col. 2014). Es interesante destacar que el tripanosomátido *Trypanosoma rangeli* presenta un repertorio de mucinas mucho menor al de *T. cruzi*, y que *Trypanosoma brucei* no codifica para genes de esta familia. Ambos casos corresponden a protozoarios extracelulares, sin capacidad de invadir células de mamífero (Bartholomeu y col. 2014).

Por otro lado, las regiones especializadas de la membrana, los microdominios lipídicos (*membrane rafts*) ricos en colesterol y el gangliósido GM1, intervienen en el proceso de invasión, principalmente a través de la organización temporal y espacial de las proteínas participantes (Fernandes y col. 2007; Hissa y col. 2012) (Figura 9).

El resultado final de la interacción parásito-célula hospedadora es el inicio de la activación de los diferentes mecanismos de invasión usados por *T. cruzi*. Hasta hoy, se han descrito cinco estrategias de invasión del parásito a la célula (Calvet y col. 2012). Una de ellas postula que *T. cruzi* activa una señal de ingreso de calcio al interior de la célula hospedadora para que se produzca el reclutamiento de lisosomas al sitio de entrada del parásito, vía conocida como dependiente de lisosomas (Figura 9 y 10) (Rodríguez y col. 1999). Los posibles mecanismos desencadenantes del aumento de  $Ca^{2+}$  citoplasmático son diversos, y uno de ellos sería disparado por mucinas (Villata y col. 2008). Otra de las estrategias de invasión es la dependiente de actina, descrita en la Figura 9, en la cual se produce una reorganización en el citoesqueleto celular para la internalización del parásito (De Souza y col. 2010; Calvet y col. 2012). Este proceso fue demostrado en células cardíacas (Barbosa y col. 1995).

Además, se observó que la unión de *T. cruzi* a algunas de las moléculas de adhesión, como la proteína gp82, activa diversas cascadas de señalización que serían responsables de la internalización del parásito. Una de ellas es la PI-3 quinasa, cuya activación facilitaría la entrada del parásito a través de invaginaciones de la membrana plasmática ricas en  $PIP_3$  [fosfatidil-inositol (3,4,5) trifosfato], como se encuentra ilustrado en la Figura 9. Otras moléculas de superficie cuya activación está implicada en el evento de entrada de *T. cruzi* son los receptores de bradiquininas (B2R y B1R), tirosín-quinasas (TrKA y TrKC), el receptor de TGF- $\beta$  (T $\beta$ R1 y T $\beta$ R2) y de endotelina-1 (ET $_A$ R y ET $_B$ R) (Ming y col. 1995; Calvet y col. 2012; De Souza y col. 2010; Andrade y col. 2012). Un evento similar ocurriría con la

activación de los receptores T $\beta$ R1 y T $\beta$ R2, en la que *T. cruzi* utilizaría algún tipo de proteasa para clivar a la forma latente de TGF- $\beta$ , y así convertirla a una forma capaz de activar a los receptores. La cascada de señalización inducida por esta citoquina sería importante en la invasión de *T. cruzi* a cardiomiocitos, y la inhibición del receptor T $\beta$ R1 dificultaría este proceso (Ming y col. 1995; Waghbi y col. 2005b y 2007).

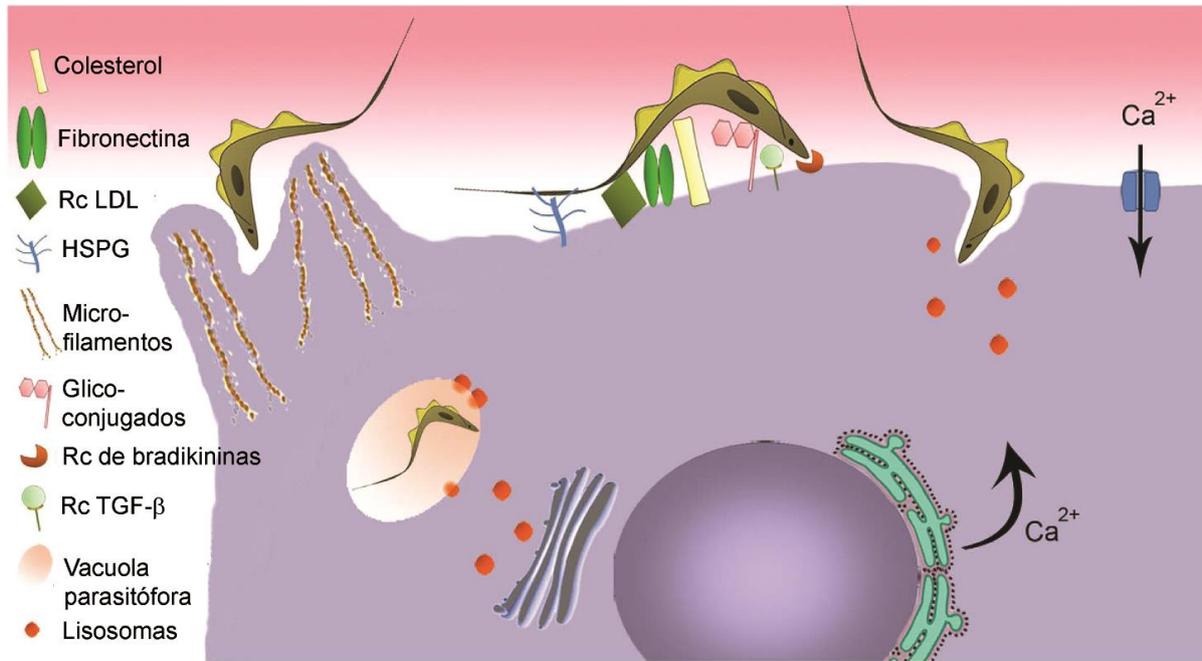


Figura 9. Proceso de adhesión e invasión de cardiocitos por *T. cruzi*. Se ilustran dos mecanismos posibles de invasión: 1) mecanismo dependiente de actina, donde los microfilamentos englobarían al parásito para formar una vacuola parasitófora; 2) mecanismo dependiente de lisosomas, en el que el parásito dispararía un aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, produciendo el reclutamiento de lisosomas en el sitio de entrada, con la consiguiente formación de una vacuola parasitófora. Figura adaptada de Calvet y col. (2012)

En una cuarta estrategia utilizada por el parásito, y que sería importante en células cardíacas, el parásito genera daños en la superficie de la célula, activando la vía de reparación de la membrana plasmática mediada por esfingomielinasa ácida (Fernandes y col. 2011). La activación de esta vía, y la consiguiente adición de ceramidas a la bicapa lipídica promovería la deformación de la membrana y favorecería la endocitosis de *T. cruzi* a las células hospedadoras (Romano y col. 2012; Barrias y col. 2013).

Por último, una quinta puerta de entrada sería a través de la vía de la autofagia de la célula hospedadora, mecanismo que fue descrito *in vitro* en muchos tipos celulares, incluidas las

células cardíacas (Romano y col. 2012; Barrias y col. 2013). Sin embargo, pueden darse combinaciones de estas vías, y la interacción del parásito con múltiples moléculas de membrana (De Souza y col, 2010; Calvet y col, 2012).

Una vez que el tripomastigote ingresó a la célula, e independientemente de la vía de entrada, el camino final sería la formación de una vacuola parasitófora, en la que los parásitos estarían presentes durante 1-2 hs. En esta etapa, las trans-sialidasas tendrían un papel importante en la protección y maduración de los tripomastigotes, ya que el ácido siálico protegería a las membranas parasitarias de la degradación (De Souza y col. 2010; Epting y col. 2010). Luego, la vacuola se fusionará con los lisosomas, y al descender del pH del medio, se activará la enzima Tc-Tox, una proteína formadora de poros, que es responsable de la degradación de la vacuola y posterior escape del parásito hacia el citoplasma celular (Alves y col, 2007; Romano y col. 2012). La acidificación del medio además, desencadenará la diferenciación hacia la forma de amastigotes, que luego de un tiempo de latencia que oscila entre 24 a 35 hs, y durante el cual hay síntesis activa de ADN, empezarán a replicarse en el citoplasma celular. El tiempo de duplicación *in vitro* es de aproximadamente 14 hs, aunque depende de la cepa de parásito (De Souza 2002; Alves y col. 2007; Epting y col. 2010).

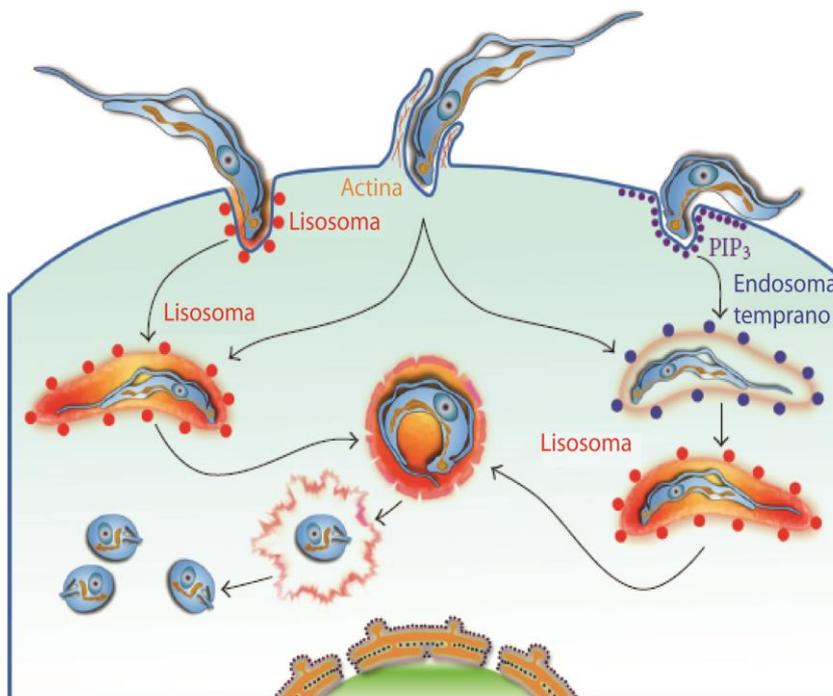


Figura 10. Mecanismos generales de invasión de *T. cruzi*, formación de la vacuola parasitófora y transformación en amastigotes. Figura adaptada de De Souza y col. (2010)

Luego de varias rondas de replicación, los amastigotes empezarán a transformarse en tripomastigotes sanguíneos, a través de una forma intermedia con características morfológicas similares a las de un epimastigote llamada epimastigote intracelular, en un proceso dependiente de prolina (De Souza, 2002; Alves y col. 2007; Waghbi y col. 2005a). Durante la transformación, los amastigotes inducirían la producción de TGF- $\beta$  en la célula hospedadora, y captarían esta molécula, que actuaría como un regulador del ciclo celular parasitario, inhibiendo su replicación y desencadenando su conversión en tripomastigotes. Por mecanismos no del todo claros, los parásitos provocarán la ruptura de la célula, con la consiguiente liberación de los tripomastigotes al espacio extracelular (De Souza, 2002; Alves y col. 2007; Waghbi y col. 2005a). Estas formas infectarán nuevas células vecinas o se volcarán hacia el torrente sanguíneo, repitiendo este ciclo, múltiples veces, con la aparición de picos de parasitemia. Es durante estos picos que una vinchuca, al alimentarse de un hospedador infectado, puede adquirir nuevos parásitos para continuar el ciclo de la infección. Debido a que la replicación y diferenciación no se produce de forma sincrónica, pueden encontrarse amastigotes cuando la célula se rompe. Los amastigotes tienen también la capacidad de infectar macrófagos (Buscaglia y col. 2006).

## Variabilidad genética y linajes

*Trypanosoma cruzi* presenta una gran variabilidad dentro de la misma especie. Basados en diferentes marcadores bioquímicos y moleculares, se establecieron dos grandes linajes, y subdivisiones de cada uno (Brisse y col. 2000). A partir de 2009, y con el objetivo de estandarizar las investigaciones respecto a la enfermedad, se llegó a un consenso de clasificación para separar lo que anteriormente se llamaban linajes y sublinajes, en 6 unidades discretas de tipificación, abreviado como UDT (Zingales y col. 2009). Las UDT abarcan de la I a VI, y pueden ser diferenciadas a partir de marcadores genéticos utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Burgos y col. 2007).

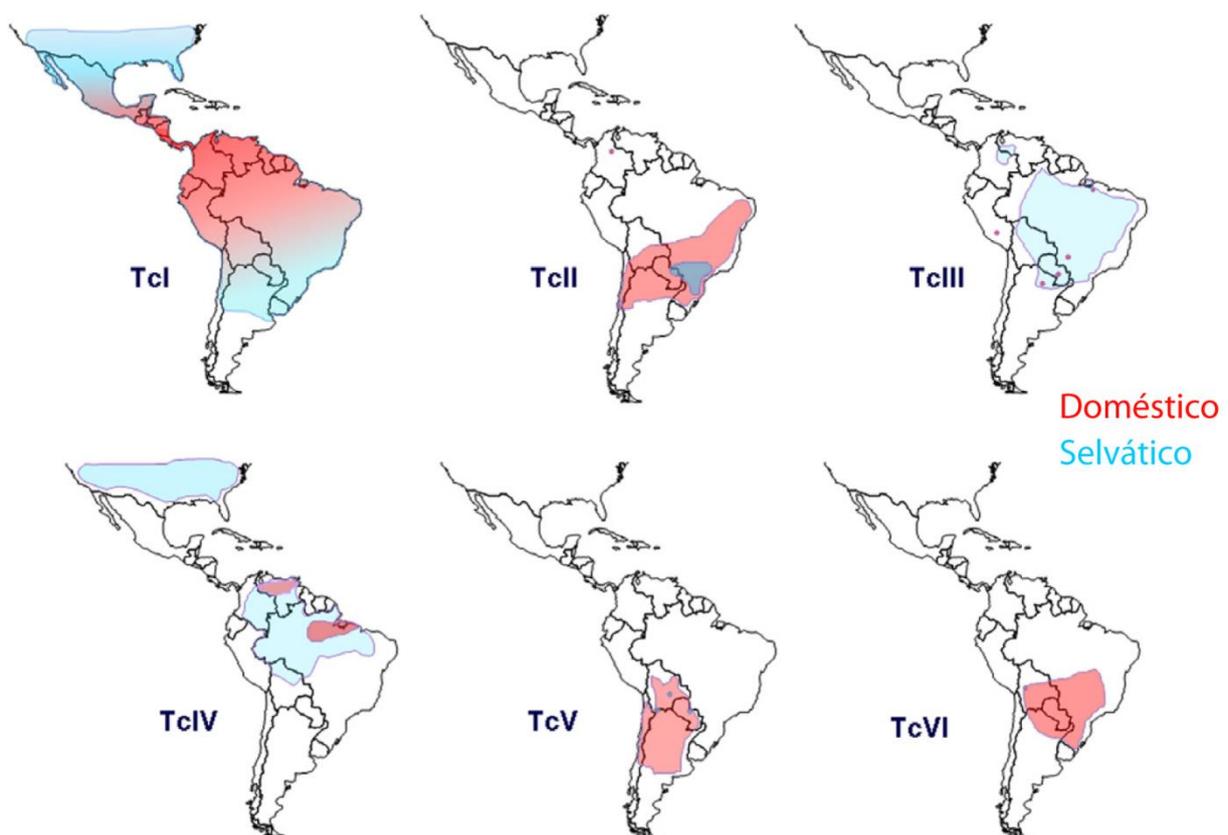


Figura 11. Distribución de las diferentes UDT en América. Adaptada de Zingales y col. (2012)

Cada UDT presenta una distribución geográfica característica (Figura 11), así como también diferente predominio en el ciclo selvático o doméstico, y variaciones respecto de los reservorios y de sus vectores (Zingales y col. 2012). Existen diferencias en lo que concierne al grado de patogenicidad de los miembros de las diferentes UDTs en modelos murinos,

aunque con un relativamente alto grado de solapamiento intergrupar, y una cierta variabilidad en cuanto a la expresión de factores de virulencia dentro de una misma UDT, que hacen difícil establecer una correlación clara. Hasta hoy, no fue posible determinar la existencia de una correlación entre las distintas manifestaciones clínicas de la patología humana y la presencia de las distintas UDTs de *T. cruzi* circulantes (Del Puerto y col. 2010; Zingales y col. 2012).

## Etapas de la enfermedad de Chagas-Mazza

### Fase aguda de la enfermedad

La enfermedad de Chagas-Mazza comienza con una fase aguda, que en la mayoría de los casos cursa con sintomatología de difícil observación en un examen clínico general. Sin embargo, la ocurrencia de manifestaciones cardíacas durante esta etapa se presentaría en más del 35% de las personas infectadas (Parada y col. 1997; Pinto y col. 2008; Alvarado-Tapias y col. 2012). Dentro de una a dos semanas de adquirida la infección, en los casos en los que existe sintomatología general, pueden presentarse fiebre (en muchos casos prolongada), náuseas, vómitos, diarrea, mialgia, linfadenopatía, edema de miembros inferiores y hepatoesplenomegalia (Pinto y col. 2008). En el sitio de inoculación del parásito, se pueden desarrollar tres tipos de manifestaciones cutáneas, una lesión inflamatoria con eritema y generalmente adenopatía satélite (chagoma de inoculación), un edema indoloro unilateral peri-orbital con conjuntivitis, y adenopatía satélite asociada, llamado también signo de Romaña o complejo oftalmo-ganglionar, y por último, y con una frecuencia menor, una erupción cutánea difusa, de intensidad variable, con ausencia de parásitos, denominada *esquizotripanides*, y que se dan generalmente en muslos, abdomen y tórax (OPS 2007; Tanowitz y col. 2009; Hemmige y col. 2012). En cuanto a los parámetros bioquímicos, existen alteraciones entre las cuales pueden encontrarse aumento de enzimas cardíacas y hepáticas (como transaminasas), anemia, y una marcada trombocitopenia (Pinto y col. 2008; Tanowitz y col. 2009). Esta disminución de plaquetas podría deberse a un aumento de su eliminación hepática, secundaria a la pérdida de residuos de ácido siálico, tras la acción de la trans-sialidasa de *T. cruzi* (Tribulatti y col. 2005).

Las manifestaciones más graves descritas de esta etapa, y que se observan más frecuentemente en niños, incluyen meningoencefalitis, miocarditis, cardiomegalia, insuficiencia cardíaca congestiva crónica, arritmias, derrame pericárdico y bloqueo de rama derecha. En un número que va entre el 2 y el 5% del total de los pacientes en los que se

detecta la infección aguda, estas manifestaciones pueden ser tan graves para llevar a la persona a la muerte (Pinto y col. 2008; Tanowitz y col. 2009; Hemmige y col. 2012; Healy y col. 2015).

Independientemente de la vía de transmisión, en la etapa aguda de la enfermedad se encuentran tripomastigotes en la sangre de las personas infectadas, por lo que el diagnóstico se hace por métodos parasitológicos, en los que se busca detectar al parásito, o su ADN. Entre los métodos utilizados están la gota gruesa, el strout, microhematocrito, hemocultivo, xenodiagnóstico (WHO2002). Recientemente, fue validada la técnica de PCR en tiempo real, para su utilización en muestras clínicas. Esta técnica presenta la ventaja de tener una alta sensibilidad y especificidad (Duffy y col. 2013)

La detección en esta etapa es muy importante porque el tratamiento de la infección alcanza elevados niveles de curación, superiores al 60% en niños en edad escolar (WHO 2002).

Los pacientes pueden tener IgM dirigidas contra el parásito, circulando en sangre, aunque no siempre son detectables, y por ese motivo su detección no es ampliamente utilizada como técnica de diagnóstico en la fase aguda (Tanowitz y col. 2009).

#### Fase crónica de la enfermedad

Luego de entre dos y cuatro meses, el sistema inmune logra controlar en parte la enfermedad, y si la infección no es tratada, sobreviene la etapa crónica asintomática, que puede perdurar durante toda la vida del paciente, y en la cual están presentes anticuerpos dirigidos contra el parásito, pero sin ninguna otra manifestación clínica. En esta etapa, el registro electrocardiográfico, radiografía de tórax y las imágenes de colon y esófago no presentan alteraciones (Dutra y col. 2009; Tanowitz y col. 2009; Viotti y col. 2014). Sin embargo, las pruebas de ecocardiografía de esfuerzo y el ecodopler, pueden detectar algunos grados sutiles de alteraciones en el miocardio, que no se observan en el electrocardiograma de reposo y el ecocardiograma normal (Tanowitz y col. 2009). Como evidencia de daño cardíaco durante esta fase, se han encontrado casos de muerte súbita posteriores a un esfuerzo en pacientes asintomáticos (Pumukollu y col. 2005). Las parasitemias son muy bajas, muchas veces por debajo del límite de detección en las técnicas actualmente utilizadas durante la etapa aguda, aunque suficientemente importantes como para transmitir la enfermedad en presencia de vectores o por transfusión sanguínea. En esta etapa, el diagnóstico se realiza por detección de anticuerpos mediante hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayo inmuno-adsorbente ligado a enzimas (ELISA). Puesto que ninguna metodología es

determinante *per se*, la OMS ha establecido que es diagnóstico para infección con *T. cruzi* cuando al menos dos de estos métodos son positivos (WHO 2002).

Décadas más tarde, aproximadamente el 30-40% de las personas infectados manifiestan alteraciones clínicas, ya sean alteraciones cardíacas como la Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC) con una incidencia de 20-30%, digestivas como el megaesófago o megacolon, con una frecuencia de (6-10%), o mixtas (Dutra y col. 2009; Hemmige y col. 2012; Viotti y col. 2014).

### Cardiomiopatía chagásica crónica y patogénesis de la enfermedad

La CCC es una cardiopatía dilatada con infiltrados inflamatorios focales o diseminados, destrucción de músculo cardíaco, fibrosis progresiva y con alta prevalencia de anomalías en la conducción, disfunción de nódulo sinusal, arritmias ventriculares complejas y trombos apicales (Esper y col. 2015; Healy y col. 2015; Tanowitz y col. 2009). Un signo distintivo de esta patología es el aneurisma apical del ventrículo izquierdo, que se observa en el diagnóstico por imágenes o en la autopsia (Tanowitz y col. 2009; Machado y col. 2012). En el corazón de pacientes con este tipo de cardiopatía, raramente se observan parásitos, aunque sí puede detectarse su ADN por PCR, y hay un infiltrado inflamatorio con predominio de células T, en relación  $CD8^+ : CD4^+$  mayor a 2:1, presencia de macrófagos, y altos niveles locales de IL-4, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Bonney y col. 2008; Cunha-Neto y col. 2014). En referencia a las alteraciones electrocardiográficas, se detecta bloqueo de rama derecha asociado con un bloqueo de fascículo anterior, así como también extrasístoles ventriculares, alteraciones en la repolarización y taquicardia ventricular (Pumukollu y col. 2005; Tanowitz y col. 2009; Machado y col. 2012).

La cardiomiopatía chagásica lleva a una alta tasa de mortalidad debido a arritmias ventriculares, insuficiencia cardíaca congestiva o embolias pulmonares y cerebrales (Rassi y col. 2000; Pumukollu y col. 2005). Carod-artal y col. (2003) sugieren una causalidad entre la enfermedad de Chagas-Mazza y accidentes cerebrovasculares isquémicos.

Hasta el momento, se desconocen los eventos que desencadenan el pasaje de la etapa crónica asintomática a la CCC. Actualmente, se postulan dos hipótesis para explicar la patología cardíaca: la persistencia del parásito en el tejido cardíaco, y la respuesta inmune desarrollada contra antígenos propios, como consecuencia de la infección por *T. cruzi*.

Siguiendo esta última línea, y al igual que ocurre en otras insuficiencias cardíacas no chagásicas, varios autores han demostrado la presencia de anticuerpos con capacidad moduladora de la actividad cardíaca en suero de pacientes con CCC (Freedman y col. 2004; Labovsky y col. 2007; Medei y col. 2007). También, se demostró que la adsorción de las inmunoglobulinas presentes en sueros, con matrices que unen los anticuerpos anti-receptor  $\beta$ 1-adrenérgicos, disminuía marcadamente el efecto funcional de los mismos sobre cultivos de cardiocitos neonatales de rata (Labovsky y col. 2007). Trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron que existe una fuerte correlación entre la sintomatología cardíaca y la presencia de anticuerpos circulantes dirigidos contra las proteínas ribosomales P del parásito, que tienen capacidad de reconocer y actuar como agonistas parciales de los receptores cardíacos  $\beta$ 1-adrenérgico y M2-muscarínico. (Levin y col. 1993; Kaplan y col. 1997; López Bergami y col. 2001; Smulski y col. 2006; Labovsky y col. 2007). Otros anticuerpos que se encuentran frecuentemente en pacientes con CCC son aquéllos que reconocen a la cadena pesada de la miosina humana y a la proteína B13 de *T. cruzi* (Cunha-Neto y col. 1996). Es extensa la lista de anticuerpos con reactividad cruzada entre proteínas del parásito y del hospedador mamífero que han sido descritos en la literatura (Acosta y col. 1985; Cunha-Neto y col. 1996; López Bergami y col. 2001; Bilate y col. 2008; Ribeiro CH y col. 2009). Más aún, se han detectado células T CD4<sup>+</sup> con capacidad de reconocer antígenos propios del hospedador en tejido cardíaco de animales experimentalmente infectados, así como también en pacientes con CCC (Silva-Barbosa y col. 2000; Cunha-neto y col. 2011).

Sin embargo, hace ya varios años emerge el concepto que postula que la acción directa del parásito así como la respuesta inmune generada en el hospedador son los principales mecanismos responsables de la patología cardíaca y digestiva (Gironés y col. 2004; Dutra y col. 2009; Nagajyothi y col. 2012). Así, se ha demostrado una fuerte respuesta celular con predominio de células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , no sólo en corazón sino también a nivel sanguíneo (Dutra y col. 2009). Cunha-Netto y col. (2005) proponen a la desregulación de citoquinas secundaria a la infección por *T. cruzi* y en especial a la acción de IFN- $\gamma$  como responsables de la hipertrofia cardíaca de la CCC. En sangre periférica de pacientes con este tipo de cardiopatía se observó un menor número de células T<sub>reg</sub> productoras de IL-10, sugiriendo que estas células serían importantes en el control de la inflamación producida en la CCC (Cunha-neto y col. 2014). TGF- $\beta$  es una citoquina que está regulada positivamente durante la infección y que también podría tener un efecto de inducción de la fibrosis sobre el corazón (Araujo y col. 2002; Waghbi y col. 2007). Por otro lado, los daños por acción directa del parásito estarían directamente relacionados a la

generación de radicales libres debido a alteraciones en el potencial de membrana de mitocondrias de cardiomiocitos que contribuyen a la sintomatología observada en esta fase (Gupta y col. 2009). También se postula que la estimulación sostenida durante años de las células del sistema inmune, genera el agotamiento de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, encargadas de un control adecuado de la infección parasitaria (Albareda y col. 2006 y 2009).

Además, la degeneración neurogénica por denervación del corazón (disautonomía) así como también alteraciones en la microcirculación, que generarían los focos isquémicos observados en los corazones con CCC, contribuirían al desarrollo de la patología (Bonney y col. 2008; Machado y col. 2012).

Si bien la patología de la CCC es multifactorial, está claro que la presencia de diferentes linajes del parásito, así como los componentes del sistema inmune del hospedador, determinan el progreso de la forma indeterminada de la enfermedad a la cardiopatía crónica (Burgos y col. 2010; Healy y col. 2015). Es por eso que el nuevo paradigma actual acepta la persistencia del parásito como un factor importante en el desarrollo de la CCC (Viotti y col. 2014).

## Tratamiento

Las drogas disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas-Mazza son el Nifurtimox, y el Benznidazol. Ambos medicamentos son casi 100% efectivos para la cura de la enfermedad cuando son administrados durante la fase aguda, infección congénita, así como también en los estadios iniciales de la fase crónica en niños de hasta 12 años, que en algunos casos, se extiende hasta los 16 años (OPS, 2007; Ribeiro y col. 2009). Además, el tratamiento está indicado en casos de reactivación de la infección por inmunosupresión del paciente, y en casos de reinfección.

No existe consenso aún en el uso de Nifurtimox y Benznidazol durante la fase crónica en adultos, existiendo estudios que avalan el tratamiento de los pacientes, y estudios en los que la medicación no logró mejorar la sintomatología cardíaca, aunque se observó una disminución de la presencia del parásito en sangre (Ribeiro y col. 2009; Viotti y col. 2014; Morillo y col. 2015).

## Infección en animales y modelo experimental

Existen varios animales que se utilizan como modelo para el estudio de la enfermedad de Chagas-Mazza, tales como el ratón (*Mus musculus*), rata (*Rattus norvegicus*), cobayo (*Cavia porcellus*), perros (*Canis lupus familiaris*), y a especies de monos como el mono capuchino (*Cebus apella*) y el mono Rhesus (*Macaca mulatta*). Algunas de estas especies, como el perro, el cobayo y el mono Rhesus, siguen patrones de infección que se asemejan a las observadas en humanos; otras como la rata y el ratón, tienen respuestas diferentes, pero aun así, representan modelos experimentales apropiados por la facilidad de obtención de grandes cantidades de animales, y por el acortamiento de los tiempos de cada una de las etapas de la infección, que en el humano pueden ser de décadas (Tanowitz y col. 2009; Bermejo y col. 2013; Steimetz y col. 2012; Castro-sesquen y col. 2011; Barr y col. 2005; Riarte y col. 1995; Espinola y col. 2003).

A pesar de sus limitaciones, el modelo murino es uno de los más ampliamente utilizados. En este modelo, y a diferencia de la enfermedad de Chagas-Mazza en humanos, la etapa aguda de la enfermedad, según la cepa parasitaria, puede presentar una sintomatología leve o una elevada mortalidad dentro de los grupos experimentales (Postan y col. 1987; Bustamante y col. 2005; Pérez y col. 2005; Rodrigues y col. 2010). En dicho modelo, además de las disimilitudes en cuanto a la susceptibilidad a la infección experimental por *T. cruzi* debida a la cepa parasitaria, existen diferencias que son dependientes de la cepa de ratones utilizada, como las distintas respuestas inmunes generadas por los animales para resistir la infección, y el tropismo por diferentes órganos. Uno de los factores que explican estas diferencias sería la presencia de diferentes genes del complejo mayor de histocompatibilidad entre las distintas cepas de animales endocriados (Andrade y col. 2002). Trabajos del grupo del Dr. Bottasso demostraron que la diferencia en la susceptibilidad de ratones de las cepas BALB/c y C57Bl/6 a la infección aguda experimental con tripomastigotes de la cepa Tulahuén, está relacionado con diferencias en el balance entre citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, y al desarrollo de una adecuada respuesta inmune IgG. La mayor producción de TNF- $\alpha$  por parte de los macrófagos de ratones de la cepa C57Bl/6, y la consiguiente atrofia tímica provocan una mayor mortalidad de estos animales, respecto a los animales de la cepa BALB/c. La mortalidad disminuyó cuando se administraron tratamientos que tendían a reducir parcialmente la producción de TNF- $\alpha$  (Rogerio y col. 2004; Pérez y col. 2005).

Por otro lado, se observó que dentro de la misma cepa de ratones, existen diferentes respuestas a la infección para ratones machos y hembras, ya que concentraciones bajas de

estradiol administradas exógenamente a ratones de ambos géneros de la cepa C57Bl/6, tendrían un efecto protector en infecciones experimentales agudas de *T. cruzi* (E. De Souza y col. 2001).

El modelo crónico murino de infección experimental por *T. cruzi* refleja mejor algunas de las características de la enfermedad humana. Tanowitz y col. (2009) encontraron variaciones significativas en parámetros ecocardiográficos como una disminución en el porcentaje de fracción de acortamiento, una reducción del grosor de la pared ventricular izquierda y un incremento del diámetro de fin de diástole. En infecciones experimentales en ratones de la cepa Swiss Albino, utilizando bajas cantidades de tripomastigotes de la cepa Tulahuén, Laguens y col. (1981), lograron reproducir muchas de las características de una infección crónica humana, como la baja parasitemia, la presencia de infiltrados inflamatorios mononucleares con variable grado de fibrosis, y la ausencia de nidos parasitarios detectables al microscopio óptico en biopsias de corazón. A nivel electrocardiográfico también existían similitudes como las extrasístoles ventriculares, el ensanchamiento del complejo QRS y bloqueos aurículo-ventriculares. Bustamante y col. (2005) también realizaron experimentos en ratones Swiss Albino, y observaron algunas de estas alteraciones, así como también la dependencia de la cepa de parásitos utilizada para la infección.

La posibilidad de generar infecciones agudas con alta sintomatología, y la similitud de la etapa crónica con la infección humana, sumada a la disponibilidad de varias cepas endocriadas y la posibilidad de obtener animales transgénicos hacen del modelo murino, un instrumento apropiado para el estudio de distintos aspectos de la enfermedad de Chagas-Mazza.

## Glicanos y lectinas

Las células poseen un elevado repertorio de glicanos unidos covalentemente a las proteínas y lípidos presentes en la membrana formando de esta manera las glicoproteínas y los glicolípidos. Estos glicoconjugados tienen un papel crítico en diversos procesos biológicos tales como adhesión y repulsión celular, discriminación entre lo propio y lo no propio, tráfico de moléculas, endocitosis y activación de receptores (Figura 12) (Ohtsubo y col. 2006).

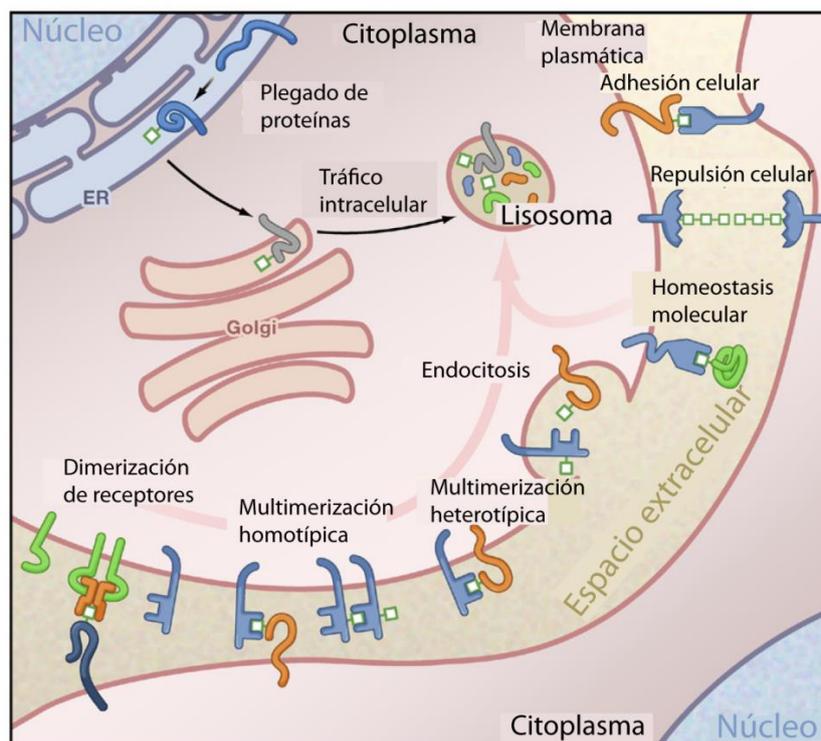


Figura 12. Funciones de los hidratos de carbono de la célula. Adaptado de Ohtsubo y col. (2012)

Los patrones de glicanos presentes en la célula se hallan controlados por la acción regulada de glicosiltransferasas y glicosidasas presentes en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Rabinovich y col. 2009; Van Kooyk y Rabinovich, 2008). Estas vías enzimáticas se hallan genéticamente conservadas y representan alrededor del 1-2% de las proteínas codificadas en el genoma (Ohtsubo y col. 2006). Sólo 9 sacáridos son utilizados en glicoconjugados de mamíferos: galactosa, N-acetilgalactosamina, glucosa, N-acetilglucosamina, manosa, fucosa, ácido glucurónico, xilosa y ácido siálico, y este hecho, sumado a la presencia de un esqueleto común para los N-glicanos, se traduce en una menor complejidad estructural respecto de otros organismos (Ohtsubo y col. 2006; Rabinovich y col. 2009; Schnaar 2015). En la Figura 13 puede observarse un esquema de la membrana

plasmática con una glicoproteína que presenta N- y O-glicanos, proteoglicanos y un glicolípido.

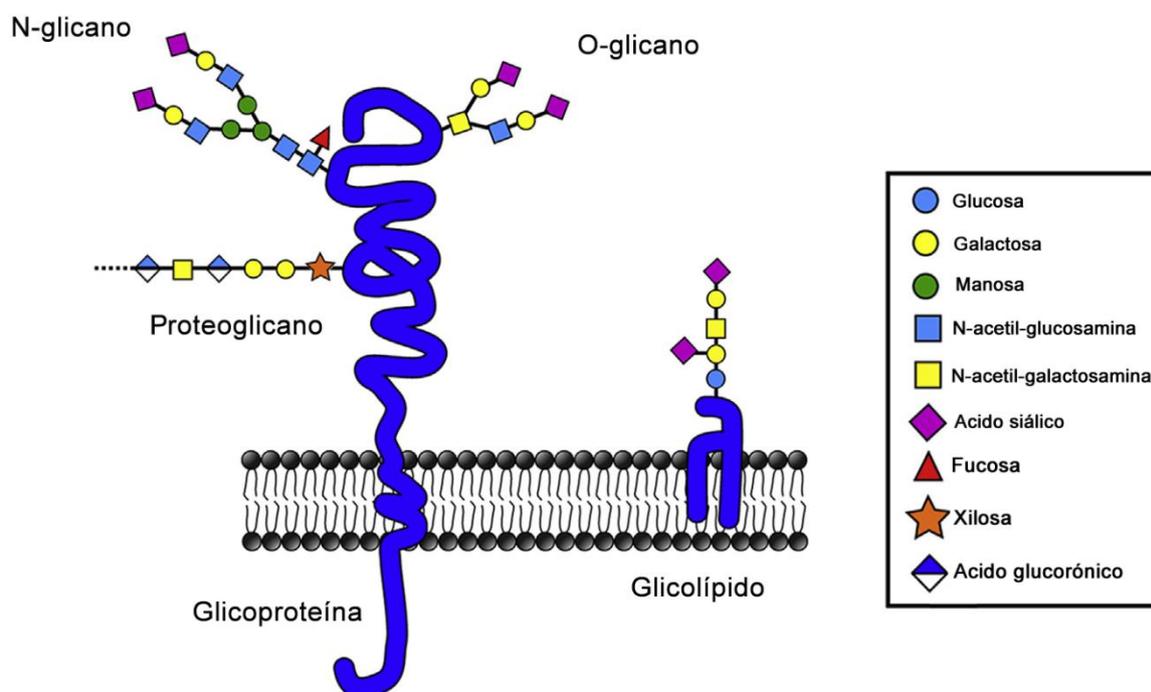


Figura 13. Glicoconjugados de membrana. En este esquema pueden observarse ejemplos de glicoproteínas y de glicolípidos en una membrana celular. Figura adaptada de Schnaar (2015)

Los glicanos poseen funciones estructurales, contribuyendo al plegado y a la estabilidad de las proteínas, pero muchas de sus funciones las ejercen a través de su unión a proteínas específicas de unión a hidratos de carbono llamadas lectinas, que tienen la función de decodificar la información biológica encriptada en estos glicanos (Ohtsubo y col. 2006; Rabinovich y col. 2009; Schnaar 2015). La especificidad de unión lectina-grupo glicosídico posibilita el análisis de la estructura oligosacáridica presente en la membrana celular a partir del uso de lectinas vegetales biotiniladas (Crocchi y col. 2014).

Los glicoconjugados de proteínas son en su gran mayoría, N-glicanos, O-glicanos y glicosaminoglicanos. Los N-glicanos, a su vez, se clasifican en tres grupos llamados de alta manosa, complejos (tri-antenarios, tetra-antenarios) o híbridos, según cuáles sean los sacáridos terminales (Kornfeld y col. 1985) y se unen a través de un residuo de asparagina, a proteínas con el motivo Asn-X-Ser/Thr. Los O-glicanos y los glicosaminoglicanos se unen a través del grupo alcohol lateral de residuos de serina o treonina. Los N-glicanos se sintetizan por sucesivas rondas de adición y delección de monosacáridos a un esqueleto oligosacáridico común rico en residuos de manosa cuya fórmula es  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , mientras que los O-

glicanos se sintetizan por elongación sucesiva de las cadenas de glicanos, formando estructuras lineales o ramificadas. Los glicosaminoglicanos tienen vías biosintéticas totalmente diferentes del resto de los glicanos, son lineales, y generalmente presentan un alto grado de sulfatación. Si bien existen glicoproteínas citoplasmáticas y nucleares, la mayoría de las proteínas glicosiladas están presentes en la vía secretoria o como proteínas transmembrana (Ohtsubo y col. 2006; Rabinovich y col. 2009).

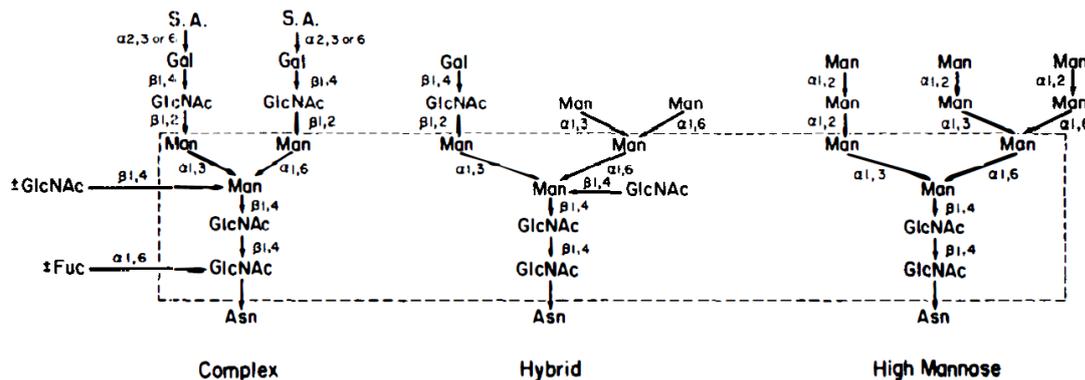


Figura 14. Tomado de Kornfeld y col. 1985

Los glicoconjugados de lípidos, mayoritarios en mamíferos son los glicoesfingolípidos (GEL), y los glicoconjugados anclados a membrana a través de anclas de glicofosfatidilinositol (GPI). En los GEL, el grupo sacarídico está unido a través de uno de los grupos alcohol de una molécula del lípido ceramida. El 90% de estos glicolípidos derivan de glucosil-ceramida, mientras que el 10% restante, tiene como molécula de unión, a la galactosa. Los glicoconjugados pueden ser simples, y consistir sólo en estos grupos, o derivados como éster sulfato, sulfátidos (sulfogalactosil) y otros unidos al esqueleto lipídico, o ser más complejos. La presencia de una determinada secuencia glicosídica de ambos tipos de GEL, permite clasificarlos en gangliósidos ( $\text{GalNAc}\beta 1\text{-4Gal}$ ), globósidos ( $\text{Gal}\alpha 1\text{-4Gal}$ ), lactósidos ( $\text{Gal}\beta 1\text{-3GlcNAc}\beta 1\text{-3Gal}$ ) y neolactósidos ( $\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-3Gal}$ ). Los distintos tipos de GEL pueden predominar en determinados órganos, y pueden estar sialilados, sulfatados o ser neutros. Los GEL están agrupados en parches de membrana (*membrane rafts*), y presentan distintas funciones, una de ellas es la de modular la transducción de señales de receptores de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), Factor de Crecimiento Neuronal (NGF) y de la insulina, al interactuar lateralmente con otros componentes de la membrana celular. También son importantes en la mielinización neuronal, y en interacciones célula-célula (Ohtsubo y col. 2006; Schnaar y col. 2009; Lingwood 2011).

Como se mencionó anteriormente, el otro grupo de glicoconjugados mayoritario es el presente en las anclas de glicofosfatidil-inositol (GPI), a través del cual se unen glicoproteínas de superficie a la célula. El ancla GPI está formada por un núcleo glicosídico unido a un fosfolípido, y a un puente de fosfo-etanolamina, al que se une una proteína. La función de este grupo es la de anclar distintas proteínas a la membrana externa de la célula formando una unión estable y resistente a la mayoría de las lipasas y proteasas. La estructura del núcleo glicosídico está formada por fosfo-inositol, y un número variable de residuos de manosa, glucosamina y grupos variables en sus cadenas laterales (Paulick y col. 2008).

Una mención especial merece la familia de monosacáridos denominados ácido siálico, la cual comprende estructuras sacarídicas ácidas con esqueletos de 9 carbonos, cuyos miembros más representativos en mamíferos son el ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac) y el ácido N-glicolil neuramínico (Neu5Gc) (Freire de Lima y col. 2012). La importancia de estas estructuras radica en sus múltiples funciones en la interacción con lectinas y en que está involucrado en el enmascaramiento y protección de estructuras oligosacarídicas del hospedador, pero también en que es aprovechado por múltiples patógenos para evadir fenómenos de la respuesta inmune o la fagocitosis. Al menos 20 patógenos extraen ácido siálico de glicoconjugados del hospedador, y lo incorporan a sus proteínas de membrana (Van Kooyk y Rabinovich, 2008). Esta familia de glicanos presenta un rol importante en la enfermedad de Chagas-Mazza, en donde *T. cruzi*, lo utiliza para ocultar los residuos  $\alpha$ -galactosil de sus mucinas y generar, de esa manera una densidad de cargas negativa que lo protege de la respuesta inmune del hospedador (Giorgi y col. 2011). *T. cruzi* es incapaz de sintetizar ácido siálico, lo que obliga al parásito a adquirirlo a partir de la superficie de la célula hospedadora, mediante la familia de enzimas trans-sialidasas, proteínas importantes en los procesos de invasión, y evasión de la respuesta inmune (Libby y col. 1986; Schenkman y col. 1991; Buscaglia y col. 2006; Freire de Lima y col. 2012).

Las lectinas son proteínas de unión a glicanos, y pertenecen a tres grandes familias, las lectinas de tipo C, las lectinas del tipo de las inmunoglobulinas que unen ácido siálico (Siglecs, a partir de su sigla en inglés) y las galectinas (Van Kooyk y Rabinovich, 2008).

Las lectinas de tipo C, o lectinas dependientes de calcio, son un grupo de proteínas con homología estructural en su dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD, por sus siglas en inglés), que requieren de calcio para la unión con su ligando. A pesar de su homología, los miembros de esta familia difieren en la especificidad por sus ligandos e

incluyen las selectinas, dectinas, colectinas, entre otras. Cada una de estas familias ejerce distintas funciones, relacionadas principalmente con fenómenos de inmunidad, inflamación y adhesión (Cummings y col. 2009; Schnaar, 2015; Bochner y col. 2015).

Las Siglecs son una familia de lectinas, que están presentes en mamíferos y que reconocen distintos motivos de carbohidratos sialilados. Algunos miembros de esta familia presentan ortólogos altamente conservados entre las distintas especies de mamífero, mientras que las que se conocen como Siglecs relacionadas con CD33, presentan mayor variabilidad interespecie. Estas lectinas son receptores transmembrana que presentan un dominio extracelular N-terminal de unión a ácido siálico unido a un número variable de dominios pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), y dominios intracelulares efectores asociados a proteínas tirosin-fosfatasa, que se encuentran en la mayoría de los miembros de la familia. Estos dominios intracelulares presentan motivos que se denominan a partir de su sigla en inglés, como ITIM (motivos inhibitorios del inmunoreceptor basados en tirosina), ITSM (motivos de cambio de inmunoreceptores basados en tirosina), o en algunos casos ITAM (motivos activadores de inmunoreceptores basados en tirosina) (Jacobs y col. 2010; Macaulay y col. 2014; Bochner y col. 2015). La mayoría de las Siglecs tienen una expresión acotada a uno, o unos pocos tipos celulares. Sus funciones están relacionadas con la regulación, ya sea activación o inhibición de la respuesta inmune innata y/o adaptativa, interviniendo en la producción de citoquinas, la discriminación entre lo propio y lo no propio, metabolismo óseo, y la regulación de la función de la microglia, entre otras (Macaulay y col. 2014; Bochner y col. 2015).

## Galectinas

Dentro de las lectinas encontramos a las galectinas, una familia que cobró una importancia clave en los últimos años debido a su destacada capacidad inmunomoduladora. Es una familia de lectinas solubles que presentan al menos un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) y una estructura de plegado común, y que se caracterizan por reconocer preferentemente glicanos que contienen estructuras repetitivas del disacárido N-acetil-lactosamina (Gal $\beta$ 1-4GlcNac) (Rabinovich y col. 2007; Van Kooyk y Rabinovich, 2008; Rabinovich y col. 2009; Davicino y col. 2011). Varios miembros de esta familia son secretados y pueden actuar extracelularmente mediante la formación de redes ordenadas o 'lattices' constituidas por estructuras galectina-glicano en la superficie de la célula (Figura

15), mientras que otras galectinas podrían permanecer asociadas a membranas o actuar intracelularmente (Rabinovich y col. 2009).

Hasta el momento, se han caracterizado al menos 15 galectinas en mamíferos, de las cuales 10 se encuentran en humanos, y se clasifican como proto-galectinas, galectinas de tipo químera y galectinas repetidas en tándem. Las galectinas de tipo proto (Galectina-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 y -15) presentan un solo CRD por subunidad, y pueden formar dímeros no covalentes. Las galectinas repetidas en tándem (-4, -6, -8, -9 y -12) contienen dos CRD homólogos en una misma cadena polipeptídica, separadas por un región de unión de hasta 70 aminoácidos. Las galectinas de tipo químera, como galectina-3 (Gal-3), contienen una región N-terminal responsable de su oligomerización. Los tres tipos de galectinas carecen de señales de exportación al medio extracelular y serían secretadas por mecanismos no clásicos (Van Kooyk y Rabinovich, 2008; Vasta 2012; Schnaar 2015).

Algunas galectinas como Gal-1 y Gal-3 son ubicuas, mientras que otras tienen una localización más restringida (Van Kooyk y Rabinovich, 2008). Si bien todas reconocen el mismo grupo funcional, existen diferencias en cuanto a la especificidad de carbohidrato, plasticidad en la unión azúcar-CRD y ubicación espacial de la misma, que se manifiestan en las diferentes propiedades de unión de cada galectina a su ligando (Vasta 2012). Además, cada galectina reconoce preferencialmente un conjunto de proteínas o lípidos glicosilados ubicados en la superficie celular, la matriz extracelular o dentro de la célula (Wiersma y col. 2013). Existen varios factores que afectan la actividad de las galectinas como su grado de oligomerización, los cambios en el glicofenotipo de las células y la acción de moléculas oxidantes o reductoras (Rabinovich y col. 2012).

Mediante su interacción con los glicanos presentes en distintas glicoproteínas, las galectinas participan en la regulación de diversos fenómenos como la inflamación, tolerancia inmunológica, apoptosis, recambio de receptores, maduración, diferenciación y homeostasis celular (Rabinovich y col. 2007; Van Kooyk y Rabinovich, 2008; Rabinovich y col. 2009; Ilarregui y col. 2009). Gal-1 tiene efectos anti-inflamatorios, mientras que otras galectinas como Gal-3 parecen tener un rol preferentemente pro-inflamatorio. Además, Gal-3 estaría involucrada en algunos procesos de endocitosis, y sería importante en la fagocitosis de células apoptóticas y de antígenos opsonizados con IgG, por parte de macrófagos de ratón; un efecto que sería independiente de la unión a carbohidratos (Sano y col. 2003). Gal-3 estimula la acción fagocítica y la degranulación de neutrófilos, así como también posee un efecto pro-apoptótico sobre estas células, sólo en ausencia de fibrinógeno soluble, que es una molécula presente en los sitios de inflamación (Fernández y col. 2005).

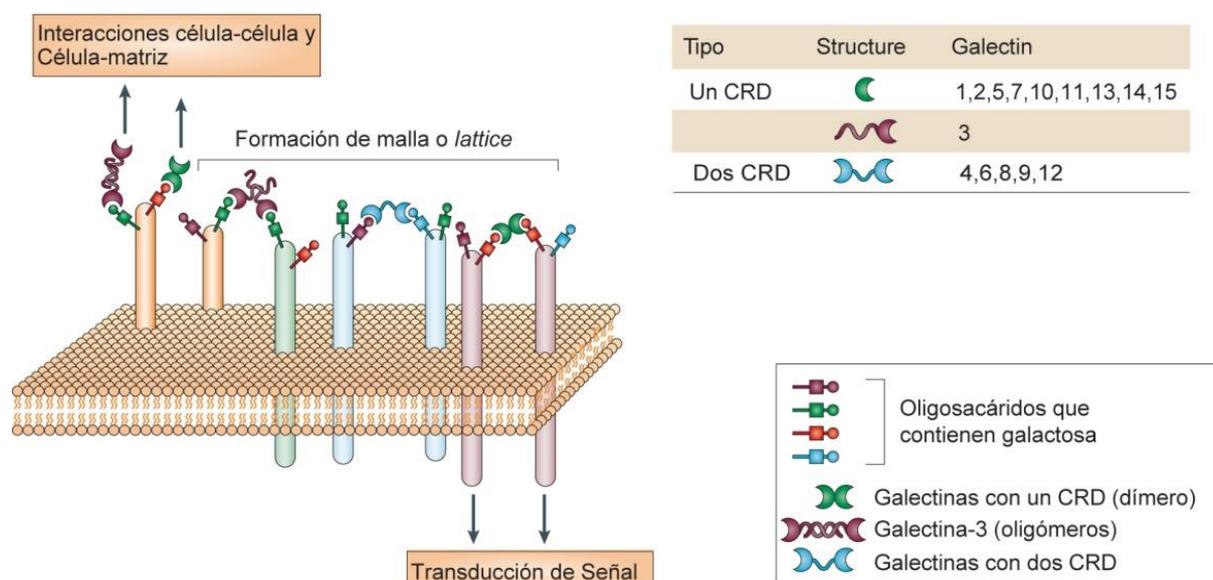


Figura 15. Galectinas y sus funciones. Adaptada de Liu y Rabinovich (2005)

Algunos miembros de la familia de las galectinas parecen tener roles más duales, como Gal-9. Esta lectina actúa extracelularmente induciendo un perfil anti-inflamatorio al favorecer la diferenciación de linfocitos T a células T<sub>reg</sub> y al promover la apoptosis de linfocitos T y de monocitos (Rabinovich y Croci, 2012). Por el contrario, Gal-9 es capaz de activar la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en monocitos, actuando intracelularmente mediante una interacción proteína-proteína. A su vez, la administración de Gal-9 recombinante mejora la sintomatología en modelos murinos de enfermedades autoinmunes experimentales (Wiersma y col. 2013).

Por su parte, para Gal-12 se han descrito funciones no relacionadas al sistema inmunológico. Esta lectina sería importante en la diferenciación de adipocitos, en el control del balance energético, y del metabolismo lipídico. A través de la modulación de la proteína-kinasa A (PKA), Gal-12 regularía negativamente la lipólisis en las gotas de grasa de las células adiposas; este efecto podría deberse a una interacción Gal-12-proteína, o Gal-12-lípido (Yang y col. 2004; Baum, 2012; Yang y col. 2012). Los ratones deficientes en el gen de Gal-12 presentan una marcada disminución de la grasa corporal y un aumento del metabolismo mitocondrial, remarcando la importancia de esta lectina en la homeostasis del tejido adiposo. Además, se ha descrito la expresión de esta galectina en otros órganos como corazón, bazo y timo, cuyas funciones aún se desconocen (Yang y col. 2004; Baum, 2012; Yang y col. 2012).

También, se ha descrito la importancia de algunas galectinas en la interacción patógeno-hospedador. Gal-3 está involucrada en la adhesión y posterior invasión de tripomastigotes de *T. cruzi* a las células musculares lisas de la arteria coronaria vía unión a carbohidratos (Kleshchenko y col. 2004). Kohatsu y col. (2006), demostraron el efecto lítico de Gal-3 sobre la levadura *Candida albicans*, al actuar como un receptor de reconocimiento de patrones (PPR) y unirse a estructuras sacarídicas propias de este patógeno oportunista.

Además, Gal-3 interviene en la supervivencia de poblaciones de linfocitos B, de ratones infectados con *T. cruzi*, y en su diferenciación por estimulación con IL-4 a linfocitos B de memoria (Acosta-Rodríguez y col. 2004). Gal-9 promovería la interacción entre *Leishmania major* y macrófagos, favoreciendo su eliminación, y además limitaría la replicación intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos infectados a través de la unión a la proteína TIM-3 (*T cell immunoglobulin mucin 3*), presente en células del sistema inmune (Wiersma y col. 2013).

En cuanto a su rol en la fisiopatología cardíaca, Gal-3 estaría involucrada en la fibrosis, el remodelado y la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca. Sharma y col. (2004) demostraron que la expresión de Gal-3 se encuentra aumentada en el corazón de ratas que luego desarrollarán una falla cardíaca, y que la administración de esta lectina recombinante en el saco pericárdico de estos animales indujo fibrosis y falla cardíaca. Además, Gal-3 serviría como valor pronóstico en humanos para algunos tipos de insuficiencia cardíaca (Sharma y col. 2004; De Boer y col. 2010; De Boer y col. 2011). Por otro lado, Pineda y col. (2015) demostraron que ratones deficientes en el gen de Gal-3 infectados con tripomastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*, presentaban un menor grado de fibrosis y de infiltrados inflamatorios en corazón comparados con ratones de tipo salvaje, aún a pesar de no presentar diferencias en los parasitismos cardíacos. Por este motivo, se postula que Gal-3 cumple un papel importante en el desarrollo de la CCC.

Asimismo, las galectinas participarían en la relación parásito-vector. En este sentido, se ha demostrado la existencia de una galectina en los insectos flebótomos *Phlebotomus papatasi* y *Phlebotomus duboscqi*, que son vectores del protozooario *Leishmania major*. Esta proteína llamada PpGalec, sería utilizada por el parásito para facilitar su adhesión al epitelio intestinal del flebótomo, a través de los residuos galactosil  $\beta(1-3)$  presentes en los lipofosfoglicanos, siendo clave en la supervivencia de *L. major* (Kamhawi y col. 2004).

Recientemente, las galectinas fueron descritas como patrones moleculares asociados a daño (DAMP, por sus siglas en inglés), es decir, moléculas que se liberan al ambiente extracelular ante el daño producido por patógenos o por una exacerbada respuesta inmune, y que generan

una respuesta. Las características que permitirían encuadrar a esta familia de lectinas dentro de las DAMP son su localización intracitoplasmática, su forma de secreción no clásica y su capacidad de modular procesos inmunológicos, tanto en el inicio de la respuesta como al final de la misma y en la reversión de los daños causados (Sato y col. 2009).

### Galectina-1

Gal-1, uno de los miembros más estudiados dentro de la familia de las lectinas, es una proteína de 135 aminoácidos, conformada por la unión de dos láminas  $\beta$  antiparalelas (Figura 16) (López-Lucendo y col. 2004). Esta lectina tiene 6 cisteínas que pueden oxidarse y reducirse, siendo el estado reducido el de alta afinidad por hidratos de carbono y el que tiene actividad de lectina. Esta forma existe como dímero en solución, y se disocia en su forma monomérica a bajas concentraciones, con una  $K_d$  de aproximadamente 7  $\mu$ M (Camby y col. 2006; Ito y col. 2012). Gal-1 se une con baja afinidad a unidades individuales de lactosamina, aunque su avidez aumenta en estructuras ramificadas de glicanos complejos (tri-antenarios y tetra-antenarios). El incremento de afinidad no se ve reflejado cuando el aumento del número de lactosaminas ocurre dentro de la misma cadena (polilactosaminas) (Camby y col. 2006).

Existen múltiples funciones ejercidas por esta lectina, tanto a nivel intracelular, como extracelular. Entre las funciones intracelulares, que son independientes de su CRD, y que involucran uniones proteína-proteína, se ha descrito principalmente su participación en el corte y empalme del ARNm (Camby y col. 2006). Las funciones extracelulares son dependientes de la unión a carbohidratos por su CRD, y han sido más estudiadas. Entre dichas funciones se pueden mencionar su rol en adhesión a la matriz extracelular, inducción de apoptosis, regulación de la inflamación y angiogénesis (Camby y col. 2006; Croci y col. 2014). La forma dimérica de Gal-1 promueve la regeneración axonal en modelos murinos de lesión experimental de la médula espinal (Quintá y col. 2014).

En cuanto a su rol inmunomodulador, es un hecho que la concentración de Gal-1 está aumentada en sitios con privilegio inmunológico como retina, testículos y placenta, y que la administración de Gal-1 exógena previene la aparición de enfermedades autoinmunes experimentales como la artritis, encefalomiелitis, colitis y uveítis (Rabinovich y col. 1999; Camby y col. 2006; Davicino y col. 2011). En este sentido, Starossom y col. (2012) demostraron efectos regulatorios de Gal-1 sobre la actividad del sistema nervioso, ya que la transferencia de astrocitos secretores de Gal-1, o el tratamiento exógeno con esta lectina,

logró prevenir los daños neurológicos en un modelo murino de esclerosis múltiple, por modulación de la actividad de la microglia.

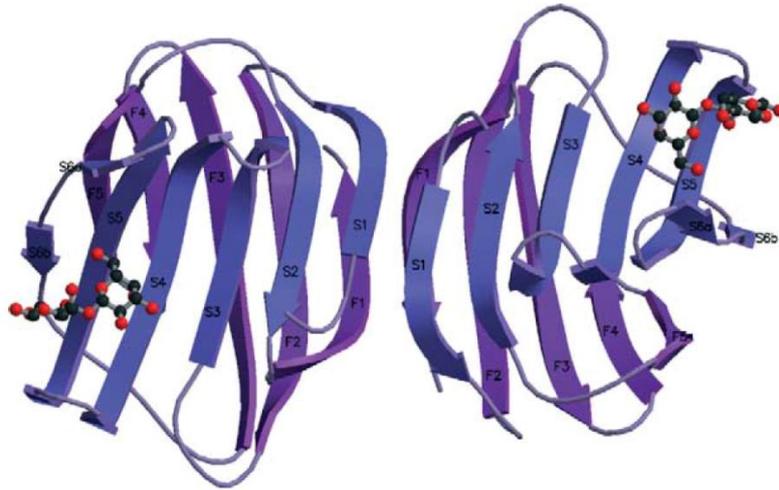


Figura 16. Representación en diagrama de cintas de la estructura cristalográfica de Gal-1 humana. Tomado de López-Lucendo y col. (2004)

Existe una gran cantidad de tumores en los cuales la expresión de Gal-1 se encuentra aumentada, y en muchos casos se correlaciona con la agresividad del tumor, la migración celular y la aparición de metástasis. Más aún, se postula que Gal-1 a nivel intracelular podría participar en la transformación de la célula a un fenotipo tumoral, y que tiene un rol fundamental en la evasión por parte de tumores, de las células del sistema inmune (Rubinstein y col, 2004). Esta lectina, estaría asociada con la estimulación de células dendríticas asociadas al tumor, que se encargarían de mediar la supresión de la respuesta T anti-tumoral (Rabinovich, 2005; Lefranc y col. 2011; Ito y col. 2012). Además, se ha demostrado que Gal-1 se encuentra aumentada en situaciones de hipoxia y que interviene en la neovascularización de tumores y en la resistencia a terapias antitumorales que bloquean la vía del VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular). Así, cambios en el perfil de glicanos presente en la membrana de las células endoteliales que las hacen más permisivas a la acción de Gal-1, conferirían resistencia a la terapia anti-angiogénica (Crocì y col. 2012; Crocì y col. 2014). Además, Gal-1 estimularía la reparación del ADN posterior a la irradiación de algunos tipos de tumores, e induciría respuestas al estrés por proteínas mal plegadas, contribuyendo con la resistencia a la radioterapia y a la quimioterapia en algunos tipos de cáncer (Lefranc y col. 2011; Ito y col. 2012).

Además, Gal-1 interviene en la regulación de las respuestas inflamatorias mediadas por linfocitos Th1 y Th17, a través de la eliminación selectiva de estas poblaciones, pero no de los linfocitos Th2. Este efecto diferencial inducido por Gal-1 se relaciona con distintos patrones de glicosilación de estas células (Toscano y col. 2007).

Seropian y col. (2012) demostraron que la expresión de Gal-1 se encontraba aumentada en ambientes hipóxicos, pro-inflamatorios, así como en la periferia de áreas que sufrieron infarto en corazones murinos, luego de un infarto agudo de miocardio. Ratones deficientes en el gen de Gal-1 (*Lgals1*<sup>-/-</sup>) a los cuales se les indujo esta patología exhibieron un número de células pro-inflamatorias mayor, y un número de células T regulatorias menor, comparado con animales *wild-type*. En dicho trabajo además, se comprobó que la administración de Gal-1 recombinante mejoraba los parámetros ecocardiográficos de los ratones infartados experimentalmente luego de la reperfusión, lo cual sugiere que Gal-1 tendría un efecto protector sobre el corazón luego del infarto agudo de miocardio (IAM).

### Galectina-1 y enfermedades infecciosas

Múltiples agentes infecciosos presentan una interacción con carbohidratos presentes en las células del hospedador. La unión del virus Influenza A a residuos de ácido siálico de glicanos de superficie de las células del hospedador durante la infección, así como la colonización de los protozoarios *Entamoeba histolytica*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* y *Cryptosporidium sp.* son algunos ejemplos de dicha interacción (Vasta, 2009). Gal-1 inhibe la infección a células de mamífero, tanto de los virus Nipah como Hendra (Figura 17a), por unión y entrecruzamiento de N-glicanos de la superficie del virión (Vasta, 2009).

Sin embargo, Gal-1 también puede ser utilizado en beneficio de patógenos, como en el caso de *Trichomonas vaginalis*, que utiliza a esta lectina para facilitar la unión de su lipofosfoglicano, rico en lactosaminas terminales, a la superficie de las células del epitelio cervical de su hospedador. De igual forma, como se observa en la Figura 17b, Gal-1 mejora la adherencia del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) a los glicanos de superficie de macrófagos (Okumara y col. 2008; Vasta, 2009).

Rajasagi y col. (2012) demostraron en un modelo murino que Gal-1 disminuye la severidad de las lesiones oculares producidas por el sistema inmune, secundarias a la infección del virus *Herpes simplex 1* (HSV1). Este efecto ocurriría por la acción apoptótica de esta galectina sobre las células Th1 y Th17, responsables de las lesiones inflamatorias. (Rajasagi y col. 2012).

En un trabajo publicado por Yang y col. (2011), los autores observaron que Gal-1 estaba regulada positivamente en lavados broncoalveolares de ratones infectados experimentalmente por el virus de la influenza, y la administración intranasal de Gal-1 recombinante reducía la inflamación pulmonar, y aumentaba la sobrevida de los animales. En experimentos *in vitro*, la sobre-expresión de Gal-1 disminuyó la producción de proteínas virales y de viriones en la línea de células de riñón canino, MDCK (Yang y col. 2011).

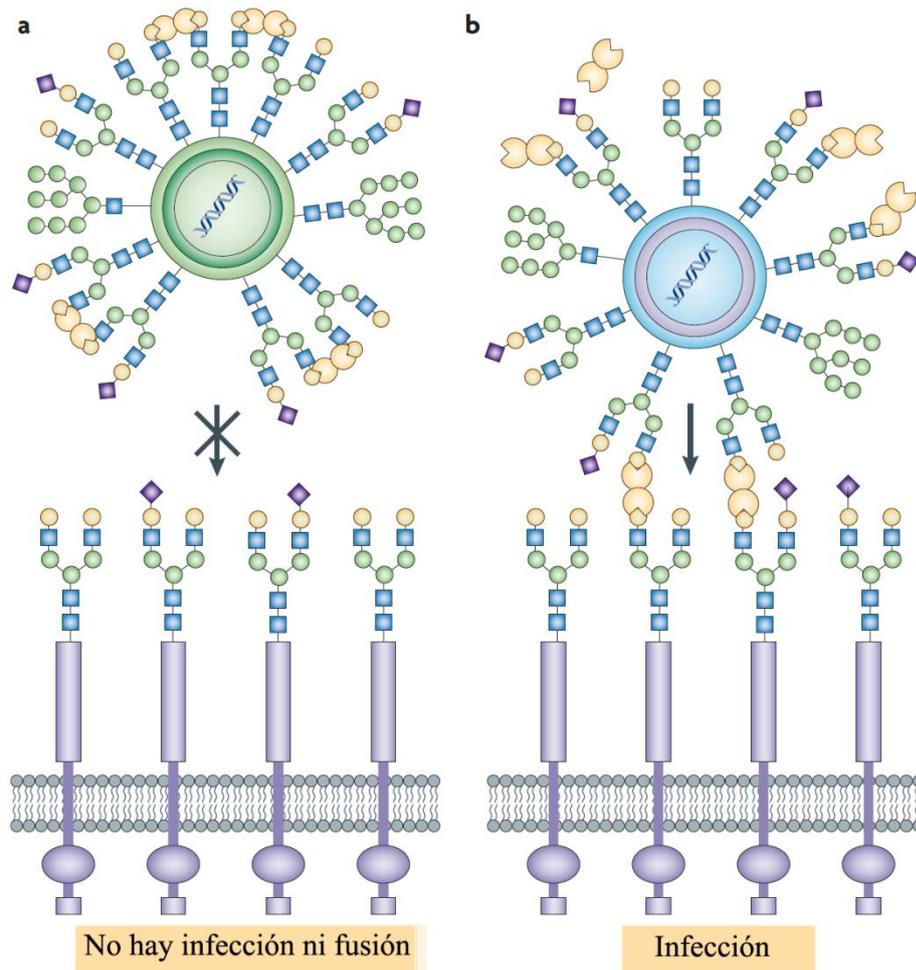


Figura 17. Gal-1 en la infección por los virus Nipah, Hendra y HIV. 17a, Gal-1 promueve el entrecruzamiento de los glicanos de la superficie del virión Nipah y Hendra, inhibiendo la fusión con las células del hospedador. 17b, Gal-1 sirve como puente para facilitar la invasión de viriones de HIV a la célula. Figura adaptada de Vasta (2009)

En relación a la enfermedad de Chagas-Mazza, se demostró que la expresión de Gal-1 se encuentra aumentada en extractos de tejido cardíaco provenientes de biopsias de pacientes con CCC. Asimismo, detectaron la presencia de anticuerpos anti-Gal-1 en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas-Mazza en estadio agudo y crónico. En este último caso, el

porcentaje de pacientes que presentaban IgG se correlacionaban con el grado de daño cardíaco (Giordanengo y col. 2001).

En la Figura 18 se ejemplifican algunos de los efectos que Gal-1 ejerce sobre diferentes tipos celulares durante la infección por *T. cruzi*. Zúñiga y col. (2001a) encontraron que Gal-1 incrementaba en células B activadas de ratones infectados con *T. cruzi*, y que esta lectina se secretaba hacia el exterior de la célula, de manera proporcional al grado de activación de dichas células. Este aumento de la secreción podría formar parte de un mecanismo de regulación de las células T.

Gal-1, además modula la actividad microbicida y la supervivencia de macrófagos infectados por *T. cruzi*, y presenta un efecto dual. En bajas concentraciones, esta lectina aumenta la replicación de los amastigotes intracelulares, mientras que concentraciones mayores de esta lectina son capaces de inducir, la apoptosis de los macrófagos infectados e inhibir la replicación parasitaria (Zúñiga y col. 2001b).

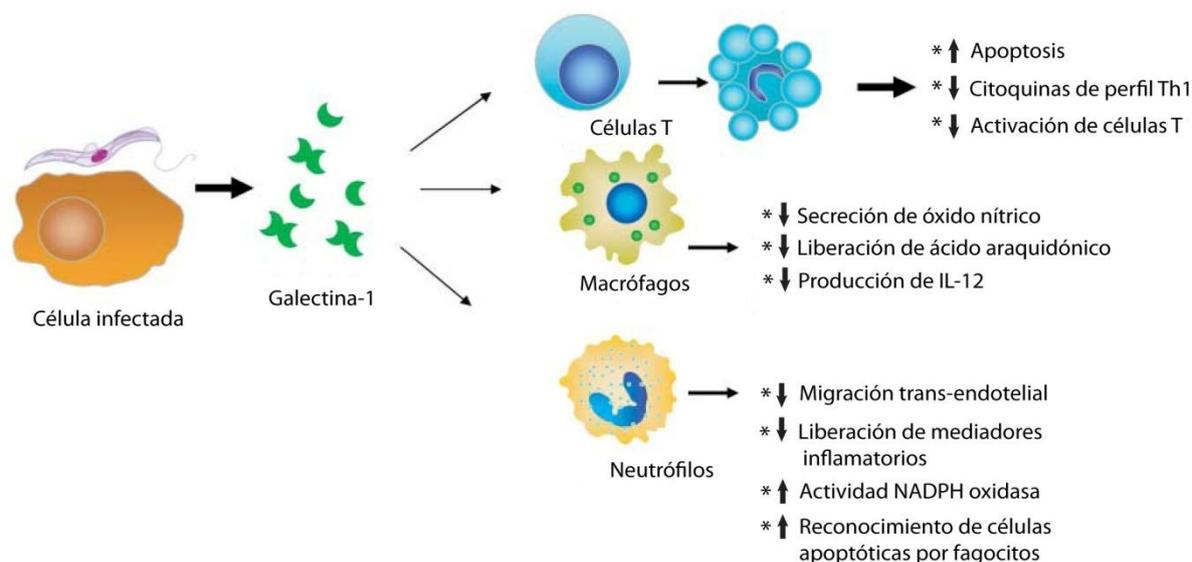


Figura 18. Efecto de Gal-1 sobre diferentes tipos celulares en la infección por *T. cruzi*. Adaptado de Rabinovich y col. (2005)

## **Hipótesis y objetivos:**

Se desconocen los mecanismos fisiopatológicos que llevan a la aparición de la sintomatología cardíaca en la enfermedad de Chagas-Mazza. Actualmente, se proponen múltiples factores, entre ellos el reconocimiento específico de las estructuras de glicanos presentes en la superficie del parásito o de las células del hospedador por proteínas de unión a glicanos, como las galectinas que podrían tener un papel crítico no sólo en la evolución de la miocarditis sino también en el control de la infección por *Trypanosoma cruzi*.

Gal-1 tiene un importante rol en la modulación del sistema inmune, y se encuentra aumentada en corazón durante la enfermedad de Chagas-Mazza. Por este motivo, se decidió profundizar en el estudio del rol de Gal-1, y de los glicanos a los que se une esta lectina en la modulación de las respuestas del cardiomiocito frente a la infección por dos linajes de *Trypanosoma cruzi* (UDT I y VI).

### Objetivo general:

El objetivo general de esta Tesis fue evaluar los cambios que se producen en los cardiomiocitos a nivel de galectinas, y de los glicanos presentes en la superficie celular ante la infección por *Trypanosoma cruzi*, así como estudiar el rol de Gal-1 en la infección de cardiomiocitos, con el propósito de establecer una posible correlación con la patología cardíaca desarrollada en los pacientes con Cardiopatía Chagásica Crónica.

### Objetivos específicos:

- Determinar los niveles de Gal-1 soluble en suero de pacientes con la enfermedad de Chagas-Mazza crónica asintomática y en pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica.
- Estudiar la expresión de Gal-1 y Gal-3 en cardiomiocitos infectados con tripomastigotes de *T. cruzi*.
- Evaluar el efecto de Gal-1 sobre la célula cardíaca frente a la infección por *T. cruzi*.
- Identificar variaciones en el perfil de glicanos presentes en la membrana de células cardíacas luego de la infección con *T. cruzi*.
- Estudiar la susceptibilidad de ratones deficientes para el gen de Gal-1 a la infección con *T. cruzi*, en relación a la aparición de alteraciones cardíacas.

## Materiales y Métodos

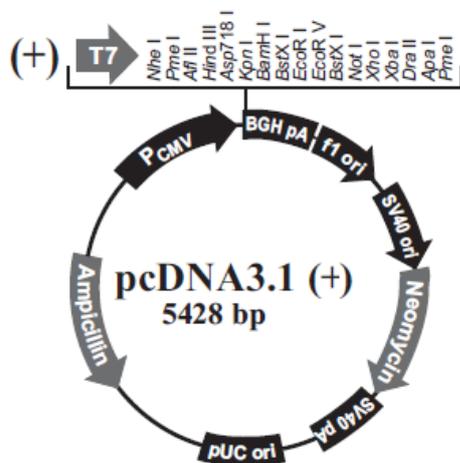
### a) Soluciones y medios de cultivo

- PBS: NaCl 17,4 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,1 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,62 g, (pH 7,4).
- PBS-T20: Tween 20 0,05% (v/v) en PBS.
- PBS-Tritón X100: Tritón X100 1% (v/v) en PBS.
- PBS-BSA: BSA 2% en PBS (p/v).
- Reactivo de Bradford: Bio-Rad Protein Assay (BioRad, EEUU), diluido 1/5 en agua.
- TBS: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, (pH 7,4).
- TBS-T20: Tween20 0,1% (v/v) en TBS.
- Solución reguladora de carbonato de sodio: NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM.
- Solución de Transferencia: Glicina 385 mM, Tris Base 50 mM, Metanol 20% (v/v).
- Solución de lisis celular: HEPES 10 mM, NP40 0,1%, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM en presencia de inhibidor de proteasas Complete Mini EDTA-Free (Roche, Alemania).
- Trizol (Gibco/BRL, EEUU).
- Solución de retrotranscripción: Tris-HCl 150 mM (pH 8,3), KCl 175 mM, MgCl<sub>2</sub> 3mM, DTT 10 mM, mezcla de dNTPs 0,5 mM.
- Solución de muestra (*cracking buffer*) 5X: Tris-Cl 300 mM (pH 6,8), SDS 10%, Glicerol 50%, β-Mercaptoetanol 25%, Azul de Bromofenol 0,05%.
- Solución colorante Rojo Ponceau: Ponceau S 0,5% (p/v), Ácido Acético 1% (v/v).
- Solución de gelatina-fibronectina: Gelatina 0,02% (p/v), Fibronectina 0,5 mg% (p/v).
- Solución Tripsina-EDTA: Tripsina 0,05 % (p/v), EDTA 5,3 mM en PBS.
- Solución PFA 4%: Paraformaldehído 4% en PBS (pH 7,4).
- Solución de Glicina: Glicina 0,02% en PBS (pH 7,4).
- Solución de tinción de Giemsa: Giemsa 2,5% (v/v), Metanol 3,125% (v/v), NaHCO<sub>3</sub> 0,125% (p/v).
- Solución de citrato-fosfato de sodio: Citrato de Sodio 0,1 M (48,6% v/v); Fosfato de Sodio 0,2 M (51,5% v/v) (pH 5,0)
- Formol: Formalina 10% en PBS.
- Solución de avertina: 2,2,2-Tribromoetanol 2% (p/v), PBS 50% (v/v).
- Solución de Lectina-BSA 1%: HEPES 0,01 M (pH 7,4), NaCl 0,15 M, BSA 1% (p/v).

- Medio de cultivo Claycomb sin suero (Sigma, EEUU): Medio suplementado con L-Glutamina 2 mM (Invitrogen, EEUU), Estreptomicina 100 µg/ml y Penicilina 100 U/ml.
- Medio de cultivo Claycomb con suero: Medio suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (v/v) (Natocor, Argentina), L-Glutamina 2 mM (Invitrogen, EEUU), Estreptomicina 100 µg/ml y Penicilina 100 U/ml.
- Medio de cultivo Claycomb-Geneticina: Medio Claycomb con suero, con el agregado de Geneticina 500 µg/ml (Gibco, EEUU).
- Medio de cultivo Claycomb-Lactosa: Medio Claycomb con suero, con el agregado de Lactosa 100 mM.
- Medio de cultivo RPMI: Medio RPMI suplementado con SFB (Natocor, Argentina) 10% (v/v), L-Glutamina 2 mM (Invitrogen, EEUU), Estreptomicina 100 µg/ml, Penicilina 100 U/ml

b) Vectores

- pcDNA 3.1 (Invitrogen, Life Technologies, EEUU)



En este vector se encuentra el gen de Gal-1. La construcción fue generada por el grupo del Dr. Rabinovich (Rabinovich y col. 1999).

c) Anticuerpos

Anticuerpo	Especificidad	Conjugado	Especie	Marca	Dilución
Suero policlonal	Gal-1	-	Conejo	Inmunización <sup>a</sup>	1:3000
IgG monoclonal	Gal-3	-	Ratón	Hibridoma	1:1000
IgG monoclonal	Actina	-	Ratón	BD Pharmigen	1:500
Suero policlonal	Tc13	-	Conejo	Inmunización <sup>b</sup>	1:500 ó 1:1000
Suero policlonal	<i>T. cruzi</i> cepa Tulahuén	-	Ratón	Inmunización <sup>c</sup>	1:1000
Suero policlonal (Fab') <sub>2</sub>	IgG de conejo	Cy3	Oveja	Sigma Aldrich	1:200
Suero policlonal	IgG de conejo	HRP	Cabra	Vector Labs	1:4000
Suero policlonal	IgG de ratón	HRP	Conejo	Sigma Aldrich	1:3000
Suero policlonal	IgG de ratón	Alexa 488	Cabra	Life Technologies	1:200
Suero policlonal	IgG de conejo	APC	Cabra	Life Technologies	1:200
Suero policlonal	Gal-1	Alexa 488	Ratón	Cell signaling	1:200
Suero policlonal	Gal-1	Biotina	Conejo	Inmunización <sup>a</sup>	100 ng/ml
IgG policlonal	Gal-1 murina	Biotina	Cabra	R&D	1:2000
IgG policlonal	Gal-1 murina	-	Cabra	R&D	1:1000

<sup>a</sup>: Croci y col. 2012; <sup>b</sup>: Souto-Padron y col. 1989; <sup>c</sup>: Esteva y col. 2002

d) Selección de pacientes

La selección de los pacientes con enfermedad de Chagas-Mazza fue realizada por el personal médico del Servicio de Cardiología del Hospital Fernández, bajo la Dirección de la Dra. Graciela Pérez Prados. El protocolo cumplió en su totalidad con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética de dicho Hospital.

Los pacientes se sometieron a examen físico, de laboratorio, radiológico, electrocardiograma, y evolución ecocardiográfica. Se consideraron como criterios de inclusión a personas entre 30 y 70 años, con 2 ó más resultados de serología positiva para enfermedad de Chagas-Mazza en diluciones de suero mayores a 1/32 (ELISA, aglutinación de partículas, IFI y HAI).

Los criterios de exclusión fueron hipertensión arterial sistémica maligna, diabetes mellitus, disfunción tiroidea, insuficiencia renal, enfermedad pulmonar crónica obstructiva, desórdenes hidroelectrolíticos, alcoholismo, obstrucción coronaria, enfermedades autoinmunes, embarazo y lactancia, tratamiento de la enfermedad de Chagas-Mazza con drogas

antiparasitarias (benznidazol o nifurtimox), y falta en el incumplimiento de la totalidad de los exámenes requeridos.

La población en estudio consistió en 28 pacientes con enfermedad crónica de Chagas-Mazza, 19 con alteraciones cardíacas demostrables y 9 en la fase asintomática de la enfermedad.

Además, se incluyeron un total de 42 individuos con serología negativa para la Enfermedad de Chagas-Mazza dentro del mismo rango etario, como grupo no infectado.

Luego de la lectura completa y firma del consentimiento informado, a cada paciente o individuo no infectado se le extrajeron 10 ml de sangre venosa, la cual se colocó en tubos de heparina. Posteriormente, se procedió a centrifugar los tubos a 800g durante 10 min y, el plasma obtenido se conservó a -20°C hasta el momento de su uso.

#### e) Animales de experimentación

La propagación de tripomastigotes sanguíneos utilizados luego para los experimentos de infección se realizó en ratones de la cepa BALB/c.

En todos los experimentos de infección, se utilizaron ratones C57Bl/6 de tipo salvaje como grupo de animales control, y ratones C57Bl/6 *Lgals1<sup>-/-</sup>*, los cuales son animales deficientes en el gen de Gal-1 (*Lgals1<sup>-/-</sup>*) (Seropian y col. 2012; Croci y col. 2014). Estos animales se mantuvieron en homocigosis por endocruzamientos.

La crianza y todos los ensayos que involucraron animales se realizaron según el procedimiento descrito en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, 8<sup>va</sup> edición (2011), en el bioterio del Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chabén. La alimentación y administración de agua a los animales fue *ad-libitum*.

#### f) Obtención y purificación de Gal-1 recombinante

Gal-1 fue producida por el Dr. Juan Pablo Cerliani (IBYME-CONICET, Buenos Aires, Argentina), a partir de cultivos de *E.coli* BL21 (DE3) transformadas con una construcción del gen de esta lectina en el plásmido de expresión pET (Novagen, Alemania), según el protocolo descrito en Barrionuevo y col. (2007). Las bacterias se indujeron con isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) en una concentración de 1 mM, y se purificaron las fracciones solubles por cromatografía de afinidad en una columna de Lactosil Sefarosa (Sigma-Aldrich, EEUU). La concentración de Gal-1 recombinante (rGal-1) se determinó por la técnica de Bradford, utilizando el reactivo Protein Assay (Biorad, EEUU), utilizando una curva patrón con seroalbúmina bovina (BSA), rango de concentraciones entre 30 a 500 µg/ml.

El contenido de lipopolisacárido (LPS) de la muestra purificada se analizó utilizando la prueba del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), a través del test Gel-clot *Limulus* (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA). Los niveles de LPS fueron <60 ng/mg.

#### g) Cultivos de células

##### - Cultivo de células HL-1

La línea celular HL-1 fue creada y gentilmente cedida por el Dr. William Claycomb del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina, Universidad de Louisiana, EEUU (Claycomb y col. 1998).

Antiguamente, los cultivos primarios de cardiocitos neonatales de rata o ratón eran uno de los únicos modelos disponibles para estudiar la funcionalidad celular cardíaca. Sin embargo, presentaban algunas desventajas, entre ellas que cesaban su replicación después de unos pocos días de cultivo inicial, y que su fenotipo carecía de muchas características propias de las células cardíacas de un animal adulto (White y col. 2004). Intentando subsanar estos inconvenientes, se creó la línea AT-1, la cual provenía de un tumor atrial de ratones transgénicos que expresaban en corazón, el antígeno T del virus del simio SV40, bajo el control de un promotor del factor natriurético atrial (ANF). Esta línea mantenía características fenotípicas de células diferenciadas adultas, pero no podía propagarse por pasajes seriados en cultivo, y necesariamente debían realizarse trasplantes en ratones con el fin de obtener posteriormente cultivos primarios a partir de esos tumores cardíacos. Mediante el uso de esta línea, Claycomb y col. (1998) lograron generar una línea de cardiomiocitos adultos murinos, llamada HL-1, que conserva la capacidad de dividirse en cultivo, a la vez que mantiene las características fisiológicas de las células atriales adultas de las que deriva, incluso su capacidad de latir. Esta línea se ha caracterizado intensivamente, demostrándose su fenotipo de cardiomiocitos diferenciados (White y col. 2004).

Más de 700 publicaciones avalan el uso de las HL-1 como modelo cardíaco para el estudio de los efectos de la hiperglucemia, señalización celular, electrofisiología, metabolismo mitocondrial, genética, y manejo del calcio, entre otros (Tan y col. 2012; Jiang y col. 2014; Dias y col. 2014; Dungal y col. 2013; Humphreys y col. 2012; Kao y col. 2014; White y col. 2004).

Para los ensayos presentados en este trabajo de Tesis, las células HL-1 se cultivaron sobre una matriz de gelatina-fibronectina, en medio Claycomb suplementado con SFB 10% (v/v),

estreptomycin 100 µg/ml, penicilina 100 U/ml y L-glutamina 2 mM, en estufa a 37°C con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### - Cultivo de células VERO

Las células de la línea VERO (células epiteliales de riñón derivadas de mono verde africano) utilizadas para la obtención de parásitos, se cultivaron en medio RPMI suplementado con SFB 10% (v/v), estreptomycin 100 µg/ml, penicilina 100 U/ml y L-glutamina 2 mM, en estufa a 37°C con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### h) Obtención de células HL-1 que sobre-expresan Galectina-1

Las células HL-1 se transfectaron con una construcción que contenía al gen de Gal-1 (*Lgals1*), en un plásmido pCDNA3.1, utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen, Life Technologies, EEUU). Para esto, las células se cultivaron en placas de 24 pocillos hasta el 70% de confluencia, se lavaron con PBS y se hizo un cambio de medio, a medio Claycomb sin suero. En paralelo, se mezcló la lipofectamina y el plásmido en una relación de 3:1 (volumen de lipofectamina en µl: masa de ADN en µg), respectivamente. La concentración de plásmido fue 0,45 µg por pocillo. Las células se incubaron con el complejo ADN-lipofectamina durante 4 hs y posteriormente, se realizó un cambio de medio a medio Claycomb fresco con suero. Luego de 24 hs, las células se incubaron en medio Claycomb en presencia de geneticina 500 µg/ml, para la selección de células transfectadas.

En paralelo, se hizo la misma transfección utilizando el vector pCDNA3.1 vacío.

El antibiótico de selección se mantuvo durante los sucesivos pasajes de las células transfectadas y, sólo se retiró durante los distintos experimentos de infección con *T. cruzi*. La eficiencia de transfección se determinó midiendo la cantidad de Gal-1 en el sobrenadante de cultivo de las células por ELISA. La concentración de Gal-1 fue entre 4 a 8 veces mayor en las células HL-1 transfectadas con el vector que contenía Gal-1 que en las células transfectadas con el vector vacío.

#### i) Cultivo de parásitos

Para los ensayos de infección, tanto para los ensayos *in vitro* en las células HL-1, como para los ensayos *in vivo* en ratones, se utilizaron parásitos de las cepas Tulahuén y Brazil

(Trischmann y col. 1980; Wynne de Martini y col. 1980). La genotipificación de los parásitos fue realizada por la Dra. Carolina Cura, mediante PCR a partir del ADN obtenido de tripomastigotes de cultivo lisados por calor, según el protocolo experimental publicado por Burgos y col. (2007, 2010). La cepa Tulahuén correspondió a la UDT VI, mientras que la cepa Brazil a la UDT I.

#### - Ensayos *in vitro*

Los tripomastigotes de cultivo que se utilizaron para los experimentos de infección de las células HL-1, se obtuvieron del medio extracelular de monocapas de células Vero infectadas. El sobrenadante de cultivo de estas células, se centrifugó a 500g por 5 min, y se descartó el sedimento para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 2.200g por 10 min para obtener los parásitos, y se resuspendió el sedimento obtenido en medio Claycomb con suero. Los parásitos se contaron en cámara de Neubauer y se ajustó la cantidad según cada experimento a realizar.

#### - Ensayos *in vivo*

Los tripomastigotes sanguíneos de ambas cepas se obtuvieron por pasajes seriados de los tripomastigotes de cultivo, obtenidos de las células Vero infectadas, en ratones de la cepa BALB/c. Los animales BALB/c se desangraron, y la sangre obtenida se diluyó en medio RPMI con suero. Los parásitos se contaron en cámara de Neubauer y se ajustó la cantidad a 12.500 parásitos/ml en medio RPMI con suero. Cada animal de experimentación (ratones C57Bl/6 de tipo salvaje y C57Bl/6 *Lgals1*<sup>-/-</sup>) recibió una dosis de 2.500 tripomastigotes en 200 µl de medio por vía intraperitoneal.

#### j) Determinación de Gal-1 por ELISA

La concentración de Gal-1 en sueros de pacientes con Enfermedad de Chagas e individuos no infectados se determinó por ELISA. Para ello, se sensibilizaron placas de 96 pocillos (NUNC Maxisorp, Affymetrix, EEUU) con un anticuerpo de captura (2 µg/ml de un anticuerpo IgG policlonal de conejo anti-Gal-1 humana) en una solución reguladora de carbonato de sodio 0,1 M (pH 9,5). Después de incubar toda la noche a 4°C, se lavaron las placas tres veces con PBS-T20 y se bloquearon los sitios libres de los pocillos con PBS-BSA 2%, por 1 h a temperatura ambiente. Las muestras (100 µl por pocillo) se diluyeron en PBS-BSA 1% (dilución 1/5) y se incubaron por 18 hs a 4°C. Luego de tres lavados, se incubaron las placas

con un anticuerpo policlonal (IgG) anti-Gal-1 humana marcado con biotina (100 ng/ml) por 1 h a temperatura ambiente, para luego lavar y agregar streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (dilución 1/3000) (Sigma-Aldrich, EEUU). Luego de 30 min a temperatura ambiente, se realizaron 5 lavados y se reveló con 100 µl de solución de TMB (tetrametilbencidina) 0,1 mg/ml y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,06% en buffer citrato-fosfato de sodio (pH 5,0). La reacción se detuvo por el agregado de 100 µl de HCl 2 N. La densidad óptica se leyó a 450 nm en un lector de microplacas Versamax (Molecular Devices, EEUU). En las mismas placas, se realizó una curva con rGal-1, utilizando concentraciones de 2,5 a 320 ng/ml para la cuantificación de la concentración de dicha proteína en cada una de las muestras analizadas.

Para la determinación de Gal-1 en sobrenadantes de cultivo se utilizó un protocolo similar, reemplazándose los anticuerpos de captura y biotinilados, por otros similares específicamente dirigidos contra Gal-1 murina (R&D, EEUU). La curva se realizó con Gal-1 murina (R&D, EEUU).

k) Determinación de galectinas en cultivos de células HL-1 infectadas y sin infectar

La presencia de Gal-1 y Gal-3 en células HL-1 sin infectar e infectadas con tripomastigotes de las cepas Tulahuén y Brazil se determinó por Western-blot, mientras que la expresión del ARNm de dichas lectinas, se determinó por RT-qPCR. La presencia de Gal-1 en sobrenadantes de cultivo de células infectadas y sin infectar se determinó por ELISA.

- Condiciones de cultivo e infección

Se sembraron  $5 \times 10^4$  ó  $2,5 \times 10^4$  células HL-1 por pocillo en una placa de 24 pocillos para la condición de 2 ó 5 días de infección, respectivamente. Luego de 18 hs, los cultivos se infectaron con tripomastigotes de las cepas Brazil o Tulahuén en una relación parásito:célula de 5:1. A las 4 hs de infección y con el propósito de eliminar los parásitos presentes en el sobrenadante de cultivo, las células se lavaron con PBS estéril y se agregaron 500 u 800 µl de medio Claycomb con suero por pocillo según fueran cultivos de 2 ó 5 días post-infección, respectivamente. En forma paralela, pocillos conteniendo células HL-1 no infectadas fueron tratadas tal como se describió para los cultivos de células infectadas.

---

- Obtención de sobrenadantes de cultivo de las células HL-1 y determinación de Gal-1 por ELISA

A los tiempos especificados, se recolectó el sobrenadante de cultivo de cada uno de los pocillos con células HL-1 infectadas y sin infectar, los cuales se esterilizaron mediante pasaje por filtros con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso. La determinación de Gal-1 en sobrenadante se realizó por ELISA, tal como se describe en el punto j).

- Obtención de lisados de células HL-1 y determinación de Gal-1 y Gal-3 por Western blot

A los tiempos indicados, y luego de la recolección del sobrenadante de cultivo, las células infectadas y sin infectar adheridas a la placa se lavaron con PBS frío, y se lisaron utilizando la siguiente solución de lisis: HEPES 10 mM, NP40 0,1%, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, en presencia de la mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Mini EDTA-Free, Roche, Alemania). Luego de 3 ciclos de congelado-descongelado, la muestra obtenida se centrifugó a 200 rpm por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , para descartar células sin lisar y se separó el sobrenadante, con posterior almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Las proteínas presentes en dichas muestras se cuantificaron por la técnica de Bradford, utilizando el reactivo ProteinAssay (BioRad, EEUU), y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas Versamax (Molecular Devices, EEUU). Para determinar la concentración de proteína en cada muestra, se realizó una curva patrón con seroalbúmina bovina (BSA), rango de concentraciones entre 30 a 500  $\mu\text{g/ml}$ .

Para detectar galectinas por *Western blot*, primero se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, utilizando el sistema Mini Protean III (BioRad, EEUU). Las muestras se diluyeron con solución de muestra (*cracking buffer*) 5X, se hirvieron durante 5 min y se sembraron aproximadamente 60  $\mu\text{g}$  de proteínas totales por calle. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 100-150V para la separación de las proteínas.

Luego, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en solución de transferencia a 90 mA por gel (amperaje constante) en un sistema de transferencia semi-seca TE 70 (Hoefer, EEUU), durante 60 min. Para confirmar la correcta transferencia de las proteínas, las membranas se incubaron con solución colorante Rojo Ponceau reversible, para luego ser decoloradas por sucesivos lavados con agua destilada. Posteriormente, los sitios libres de las membranas se bloquearon con TBS-T20, suplementado con leche descremada al 5% (p/v), durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Los anticuerpos primarios y los secundarios conjugados a peroxidasa de rábano, diluidos en TBS-T20-leche descremada 1% (p/v), se incubaron con las membranas durante toda la noche a 4°C. Entre los sucesivos pasos de incubación con el anticuerpo primario y secundario, se realizaron 5 lavados con TBS-T20, durante 5 min con agitación. Para el revelado, se utilizó el sistema de quimioluminiscencia Immobilon (Millipore, EEUU), sobre placas radiográficas Amersham Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL (GE Healthcare, Japón) y Kodak General Purpose (Kodak, EEUU/México).

Las bandas obtenidas se escanearon y se efectuó su cuantificación relativa a un gen de mantenimiento endógeno (actina), utilizando el programa ImageJ (Versión 1.41, NIH, EEUU).

#### - Obtención de ARN de las células HL-1 infectadas y determinación de la expresión relativa de genes *Lgals1* y *Lgals3* por RT-qPCR

Luego de 2 ó 5 días de infección, se descartó el sobrenadante de cultivo, y las células adheridas se lavaron con PBS frío. Posteriormente, se agregó a la monocapa de células, 250 µl de Trizol por pocillo, y la muestra se homogeneizó por agitación mecánica. La solución obtenida se transfirió a tubos eppendorf en donde se incubó 5 minutos en hielo, y luego se agregaron 100 µl de cloroformo. Cada tubo se agitó mediante el uso de un vórtex durante 30 seg, y se incubó en hielo durante 1 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 12.000g durante 15 min a 4°C, y se recolectó la fase acuosa, a la cual se le agregó 250 µl de isopropanol. Se agitaron las muestras en un vórtex durante 30 seg, se centrifugaron a 12.000g por 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con una solución de etanol 75%. Luego de una centrifugación a 12.000g por 15 min, el precipitado se resuspendió con 25 µl de agua miliQ. La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría a 260 nm en un equipo Nanodrop (Thermo, EEUU), y cada una de las muestras se guardó congelada a -80°C. Todo el material utilizado fue libre de ARNasas.

#### Retrotranscripción

Se tomó 1 µg de ARN total de cada una de las muestras obtenidas en el punto anterior, y se dejó hibridar con oligo dT<sub>12-18</sub> (Invitrogen, EEUU). La retrotranscripción se realizó utilizando la enzima Superscript Reverse II Transcriptase (Invitrogen, EEUU) a 42°C durante 50 min, utilizando la siguiente mezcla: Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DTT 10 mM, dNTPs 0,5 mM. Para cada reacción se usaron 200 U de retrotranscriptasa, y 40 U de

inhibidor de ARNasas RNaseOUT (Invitrogen, EEUU). La reacción se inactivó por calentamiento a 70°C durante 15 min.

### RT - qPCR

Para las reacciones de PCR en tiempo real se utilizó la mezcla comercial SYBR Green PCR Master MIX (Life Technologies, EEUU), y entre cada reacción sólo se variaron las concentraciones de cebadores y de  $Mg^{2+}$  (la concentración de  $Mg^{2+}$  la mezcla comercial es de 1,5 mM, y para algunas reacciones se agregó la cantidad suficiente de  $Cl_2Mg$  para llegar a 2 mM). Las curvas de fusión se realizaron después de cada reacción entre los 57°C y los 95°C. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

#### *Lgals1 murina*

mGAL-1f 5'-TGAACCTGGGAAAAGACAGC-3'

mGAL-1r 5'-TCAGCCTGGTCAAAGGTGAT-3'

La rampa de temperaturas utilizada fue la siguiente:

- 1) 10' a 95°C
  - 2) 15'' a 95°C
  - 3) 1' a 60°C
- } x 40 ciclos

La concentración de cebadores fue de 300 nM, y la de  $Mg^{2+}$  fue de 1,5 mM.

#### *Lgals3 murina*

Gal3F\_m: 5'- CCACTGACGGTGCCCTATG-3'

Gal3R\_m: 5'-CACTGTGCCCATGATTGTGATC-3'

La rampa de temperaturas utilizada fue la siguiente:

- 1) 10' a 95°C
  - 2) 15'' a 95°C
  - 3) 1' a 62°C
- } x 40 ciclos

La concentración de cebadores fue de 225 nM, y la de  $Mg^{2+}$  fue de 1,5 mM.

*GAPDH murina*

GAPDHRaton\_Fw 5´- ACTCCCACTCTTCCACCT -3´

GAPDHRaton:Rv 5´- TCCACCACCCTGTTGCT -3´.

La rampa de temperaturas utilizada fue la siguiente:

Para ser utilizado como gen endógeno en la reacción de *Lgals1*

- 1) 10´ a 95°C
  - 2) 15´´ a 95°C
  - 3) 1´ a 60°C
- } x 40 ciclos

La concentración de cebadores fue de 300 nM, y la de Mg<sup>2+</sup> fue de 1,5 mM.

Para ser utilizado como gen endógeno en la reacción de *Lgals3*

- 1) 10´ a 95°C
  - 2) 15´´ a 95°C
  - 3) 1´ a 62°C
- } x 40 ciclos

La concentración de cebadores fue de 300 nM, y la de Mg<sup>2+</sup> fue de 2 mM.

En todas las reacciones, se utilizó 1 µl de ADNc obtenido bajo las condiciones descriptas anteriormente. Las reacciones se efectuaron en un termociclador Rotor-Gene 6000 device (Corbett, Reino Unido). La cuantificación del ARNm específico se realizó utilizando una curva de calibración relativa por diluciones seriadas de ADNc de células HL-1 sin infectar. El análisis se realizó con el programa Rotor Gene Q – Puredetection (Corbett, Reino Unido).

### 1) Determinación del número de parásitos en células infectadas

#### - Cultivos

Se sumergieron vidrios estériles de 12 mm de diámetro en una solución de gelatina-fibronectina en pocillos de una placa de 24 pocillos. Luego de 2 hs, se retiró la solución y se sembraron  $2,5 \times 10^4$  ó  $5 \times 10^4$  células HL-1 por pocillo en medio Claycomb con suero, para los experimentos de curso de la infección o de invasión, respectivamente. Luego de cultivar las células durante 18 hs, se reemplazó el medio por medio Claycomb con suero, conteniendo Gal-1 en distintas concentraciones (0, 10 y 50  $\mu\text{g/ml}$ ). Las células se incubaron durante toda la noche, y luego se infectaron con tripomastigotes de las cepas Tulahuén y Brazil, según se indica en los diferentes ensayos.

#### - Ensayos de curso de la infección de *T. cruzi* en células HL-1

La infección se realizó considerando una relación 10:1 parásitos:células HL-1, respectivamente. Los tripomastigotes se incubaron con las células durante 4 hs y, luego de realizar al menos 3 lavados con PBS estéril a fin de eliminar los parásitos presentes en el sobrenadante, se agregó medio Claycomb con suero. Las células se incubaron durante 4 días adicionales, se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con PFA 2% en PBS durante toda la noche para inmunofluorescencia, o con metanol durante 10 min para tinción con una solución de Giemsa.

#### - Ensayos de invasión de *T. cruzi* en células HL-1

Para estos ensayos, se disminuyó la multiplicidad de infección a 5:1 parásitos:células HL-1, respectivamente para minimizar el número de células que pudieran ser invadidas por más de un parásito, y se trató de maximizar el tiempo en el que las células y los tripomastigotes estuvieran en contacto, por lo que el tiempo de incubación fue de 18 hs. Luego, las células se lavaron al menos 3 veces con PBS estéril para eliminar los parásitos presentes en el sobrenadante, y se incubaron durante 30 hs adicionales en medio Claycomb con suero. Las células se lavaron 3 veces con PBS, y se fijaron con PFA 2% en PBS durante toda la noche para inmunofluorescencia.

Paralelamente, para cada una de las concentraciones de Gal-1 ensayadas, se incluyeron controles con lactosa. Para ello, las células se incubaron con medio de cultivo Claycomb - lactosa (100 mM) durante el tratamiento con Gal-1, así como también durante la infección hasta el cambio de medio al día siguiente.

- Ensayos de invasión de *T. cruzi* en células HL-1 que sobreexpresan el gen *Lgals1*.

Se sumergieron vidrios estériles de 12 mm de diámetro en una solución de gelatina-fibronectina en pocillos de una placa de 24 pocillos, durante 2 hs. Luego se retiró dicha solución, y se sembraron  $5 \times 10^4$  células HL-1 transfectadas por pocillo, que se cultivaron en medio Claycomb con suero durante 18 hs. Posteriormente se realizó un cambio de medio a medio Claycomb fresco o Claycomb-lactosa (100 mM), sin agregar Gal-1 recombinante exógena al medio previo a la infección. Las células se infectaron con tripomastigotes de las cepas Tulahuén y Brazil, durante toda la noche. Posteriormente, las células se lavaron al menos 3 veces con PBS estéril para eliminar los parásitos presentes en el sobrenadante, y se incubaron durante 2 días adicionales en medio Claycomb con suero. Luego, las células se lavaron 3 veces con PBS, y se fijaron con PFA 2% en PBS durante toda la noche para inmunofluorescencia.

- Inmunofluorescencia indirecta

Los cubreobjetos con las células fijadas con PFA 2% en PBS, se lavaron 3 veces con PBS, y se trataron durante 5 min con PBS-glicina 0,02 M (pH 7,4) para inactivar los restos de PFA. Posteriormente, las células se permeabilizaron con PBS-Triton X-100 1% durante 5 min, y se incubaron con PBS-BSA 2%. Luego de 18 hs a 4°C, las células fijadas se incubaron con un suero de ratón crónico infectado con *T. cruzi*, cepa Tulahuén (dilución 1/1.000 en PBS-BSA 1%) como anticuerpo primario, y un anticuerpo IgG anti Ig de ratón conjugado a Alexa Fluor 488 como anticuerpo secundario (dilución 1/200 en PBS-BSA 1%). El tiempo de incubación de los anticuerpos fue de 1 h a temperatura ambiente. Entre los diferentes pasos de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 min con agitación suave.

El montaje de los vidrios se realizó utilizando el medio Vectashield que contenía DAPI (Vector Labs, Reino Unido). La visualización se realizó en un microscopio de fluorescencia Olympus BX41 a 200 aumentos. Las fotos fueron tomadas al azar, usando una cámara digital Olympus DP71 acoplada al microscopio.

Se contó el número de células totales en cada una de las fotos tomadas, y se determinó el porcentaje de células que contenía al menos un parásito en su citoplasma. El número de células totales analizadas por cubreobjeto fue de 2.500 a 6.000 células totales en diferentes campos al azar, y el número de replicados por tratamiento fue de 3 a 5. El recuento de células

totales se hizo de forma manual, o mediante el uso del programa Cell Profiler (versión 2.0; Broad Institute, EEUU).

#### - Tinción de Giemsa

A las células fijadas con metanol se les retiró el fijador, y se dejaron secar al aire. Posteriormente, las células se tiñeron con solución de tinción de Giemsa hasta que las muestras adquirieron la coloración por observación directa al microscopio óptico. Luego, se realizaron 4 lavados con agua corriente, y se procedió al montaje con solución de montaje Permunt (Fisher, EEUU). La visualización y toma de fotos se realizó en un microscopio de fluorescencia Olympus BX41 a 200 aumentos, en la modalidad campo claro. Se contó el número de células totales en cada una de las fotos tomadas, y se determinó el porcentaje de células que contenía al menos un parásito en su citoplasma. El número de células totales analizadas por cubreobjeto fue de 400 a 800 células totales en diferentes campos al azar, y el número de replicados por tratamiento fue de 3 a 5. El recuento de células totales se hizo de forma manual.

#### m) Determinación del grado de lisis celular en las células HL-1 infectadas.

##### - Condiciones de cultivo e infección

Se sembraron  $5 \times 10^4$  ó  $2,5 \times 10^4$  células HL-1 por pocillo en una placa de 24 pocillos para la condición de 2 ó 5 días de infección, respectivamente. Se utilizaron las mismas condiciones de cultivo e infección que en el punto k).

##### - Obtención de sobrenadantes de cultivo de las células HL-1 y determinación de Gal-1 por ELISA

A los 2 y 5 días post-infección, se recolectó el sobrenadante de cultivo de cada uno de los pocillos con células HL-1 infectadas y sin infectar, los cuales se esterilizaron mediante pasaje por filtros con un tamaño de poro de  $0,22 \mu\text{m}$ , y se guardaron en heladera para la determinación de actividad LDH, con el protocolo del punto n).

##### - Recuento de células en cámara de Neubauer

Se lavaron las monocapas con PBS, y se agregó a cada pocillo 200  $\mu\text{l}$  de tripsina-EDTA. Se incubaron durante 5 min a  $37^\circ\text{C}$  para desadherir las células, y luego se frenó la reacción

enzimática con 50 µl de SFB. Se colectaron las células mezclando 5 veces con una pipeta de 1 ml, y se guardaron en tubos eppendorf para realizar el conteo en cámara de Neubauer.

- Medición de la actividad enzimática de lactato deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes de cultivo

La medición de la actividad LDH se realizó por espectrofotometría a partir de la oxidación de NADH, reacción catalizada por la enzima. Se utilizó el kit LDH-P UV Unitest (Wiener lab, Argentina). A partir de los sobrenadantes de cultivo de células HL-1 obtenidos en el punto anterior, se atemperaron las muestras a 37°C, y se mezclaron 100 µl de sobrenadante con 700 µl de una solución provista en el kit (fosfatos 50 mM; piruvato 0,6 mM; NADH 0,18 mM), se mezcló en una cubeta de cuarzo y después de 30 seg, se midió la absorbancia basal a 340 nm. Se repitieron las mediciones al minuto, a los dos y a los tres minutos. La reacción se mantuvo en todo momento a 37°C.

La determinación de la actividad se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{LDH (U/l)} = \Delta\text{ABS}/\text{min} \times \text{Factor}_{340\text{nm}, 37^\circ\text{C}}$$

$$\text{Factor}_{340\text{nm}, 37^\circ\text{C}}: 9683$$

n) Ensayos de apoptosis

Se cultivaron 10.000 células HL-1 por pocillo en placas de cultivo de 48 pocillos en medio Claycomb con suero durante 18 hs. Posteriormente, se realizó un cambio de medio de cultivo a medio Claycomb con suero, conteniendo diferentes concentraciones de Gal-1 recombinante (0, 10 ó 50 µg/ml) y se incubaron durante 18 hs. Luego, las células se infectaron con 50.000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén o Brazil durante 18 hs, se lavaron 4 veces con PBS para eliminar los parásitos presentes en el medio de cultivo, y se incubaron durante 48 hs adicionales en medio Claycomb con suero.

La apoptosis de las células se determinó utilizando el Kit de Anexina V-FITC (BD Pharmigen, EEUU). Para ello, las células se levantaron por tratamiento con una solución de tripsina-EDTA, se lavaron una vez con PBS y luego de realizar una centrifugación a 1.200

rpm, se resuspendieron en solución de unión (Hepes 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, pH 7,4), a la que se le agregó Anexina V-FITC. Las células se fijaron en PFA 2% en PBS. Se adquirieron al menos 10.000 eventos en un citómetro de flujo FACSAria (BD Biosciences, EEUU). Los datos se analizaron con el programa WinMdi (versión 2.9).

#### ñ) Determinación del glicofenotipo de células HL-1 infectadas y sin infectar

##### - Caracterización del glicofenotipo de células HL-1 por citometría de flujo

Se cultivaron  $5 \times 10^4$  ó  $2,5 \times 10^4$  células HL-1 por pocillo en placas de 24 pocillos en medio Claycomb con suero, según si el tiempo de infección fue de 2 ó 5 días, respectivamente. Luego de una incubación de 18 hs, las células se infectaron con tripomastigotes de las cepas Brazil o Tulahuén en una relación parásito:célula de 5:1 durante 4 hs. Posteriormente, las células se lavaron al menos tres veces con PBS para eliminar los parásitos presentes en el medio de cultivo, y se las incubó con medio Claycomb con suero durante 2 ó 5 días. En forma paralela, pocillos con células HL-1 no infectadas fueron tratadas tal como se describió para los cultivos de células infectadas.

Luego de transcurrido el tiempo indicado, las células HL-1 infectadas y sin infectar se lavaron 2 veces con PBS frío, se levantaron con una solución de tripsina-EDTA y luego de centrifugar a 1.200 rpm durante 10 min, se contó el número de células en una cámara de Neubauer. Aproximadamente  $10^5$  células HL-1 infectadas o sin infectar se distribuyeron en tubos eppendorf, se lavaron 2 veces con PBS-BSA 1% frío y se incubaron con solución de lectina-BSA 1% conteniendo las siguientes lectinas biotiniladas: PNA, SNA, HPA, LEL, PHA-L, MAL II, o Gal-1-FITC en las concentraciones indicadas en la Tabla 1, durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad.

Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con solución de lectina-BSA 1%, y se incubaron con Streptavidina conjugada a FITC (dilución 1/200 en solución de lectina-BSA 1%) durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Las células se lavaron 2 veces con solución de lectina-BSA 1%, y luego de resuspender en PBS, se agregó PFA 4% en PBS gota a gota hasta obtener una concentración final del 1% (p/v). La lectura de los resultados fue realizada en un citómetro de flujo FACSAria (BD Biosciences, EEUU), adquiriendo por lo menos 10.000 eventos. Los datos se analizaron con el programa WinMdi (versión 2.9).

Lectina	Abreviatura	Especificidad por glicano	Conc. (µg/ml)
Lectina de Maní (Peanut agglutinin)	PNA	Galactosil $\beta(1-3)$ - N-acetil-galactosamina	10
Lectina de saúco europeo ( <i>Sambucus nigra</i> agglutinin)	SNA	Ácido siálico en unión $\alpha(2-6)$	4
Lectina de caracol romano ( <i>Helix pomatia</i> agglutinin)	HPA	$\alpha$ -N-acetil-galactosamina presente en O-glicanos	20
Lectina de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> agglutinin)	LEL (o LEA)	Poli-lactosamina	2
Fitohemaglutinina (Phytohemagglutinin)	PHA-L	N-glicanos ramificados complejos con lactosaminas unidas a a manosa en unión $\beta(1-2)$ y $\beta(1-6)$	2
Lectina de <i>Maackia amurensis</i> ( <i>Maackia amurensis</i> agglutinin)	Mal II	Ácido siálico en unión $\alpha(2-3)$	20
Galectina-1	Gal-1	N-acetil-lactosaminas terminales	0-50

Tabla 1. Lectinas biotinizadas utilizadas en los ensayos de glicofenotipificación de células y parásitos.

Los parámetros analizados fueron el porcentaje de células con una fluorescencia mayor al umbral de positividad, y el índice de fluorescencia específico (SFI), calculado como el cociente entre la fluorescencia media de las células incubadas con la lectina biotinizada incógnita más Streptavidina-FITC y su control de células HL-1 incubadas sólo con Streptavidina-FITC.

#### - Caracterización del glicofenotipo de células HL-1 por fluorescencia indirecta

Se cultivaron  $2,5 \times 10^4$  células HL-1 en vidrios redondos de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos en medio Claycomb con suero. Luego de una incubación de 18 hs, las células se infectaron con tripomastigotes de las cepas Brazil o Tulahuén en una relación parásito:célula de 5:1 durante 4 hs. Posteriormente, las células se lavaron 4 veces con PBS para eliminar los parásitos presentes en el medio de cultivo, y se las incubó con medio Claycomb con suero durante 5 días. En forma paralela, pocillos con células HL-1 no infectadas fueron tratadas tal como se describió para los cultivos de células infectadas.

A los 5 días post-infección, las células se lavaron 3 veces con PBS, y se fijaron con PFA 2% en PBS durante toda la noche. Las células se incubaron con solución de lectina-BSA 1% conteniendo 20 µg/ml de LEL o PHA-L y posteriormente, con Streptavidina-FITC (dilución

1/200 en solución de lectina-BSA 1%); ambas incubaciones durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Entre cada paso, las células se lavaron 2 veces con solución de lectina-BSA 1%.

El montaje se realizó utilizando glicerol 87%. La visualización se realizó en un microscopio de fluorescencia Olympus BX41 a 200 aumentos. Las fotos fueron tomadas al azar usando una cámara digital Olympus DP71 acoplada al microscopio.

o) Curva de unión de Gal-1 a células HL-1 infectadas y sin infectar

Se sembraron  $2,5 \times 10^4$  células HL-1 por pocillo en una placa de 24 pocillos, y se dejaron incubando toda la noche con medio Claycomb con suero. Al día siguiente, se infectaron los cultivos con tripomastigotes de las cepas Brazil o Tulahuén en una relación parásito:célula de 5:1. A las 4 hs, se lavaron los cultivos con PBS hasta que no quedaran tripomastigotes en el sobrenadante, y se incubaron en medio Claycomb con suero durante 5 días. Las células se levantaron con solución de tripsina-EDTA, se centrifugaron a 1.200 rpm, y se distribuyeron aproximadamente  $1-1,5 \times 10^5$  células en tubos eppendorf para ser incubadas con diferentes concentraciones de rGal-1 (0, 5, 10 y 50  $\mu\text{g/ml}$ ), en buffer de lectina-BSA 1% en presencia o ausencia de lactosa (100 mM). Luego de 90 min, las células se lavaron 2 veces con buffer lectinas-BSA 1%, y se incubaron con un anticuerpo anti-Gal-1 conjugado con Alexa488 (dilución 1/200 en buffer lectinas-BSA 1%) durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron 2 veces con solución de lectina-BSA 1%, se resuspendieron en PBS y se agregó PFA 4% en PBS gota a gota hasta obtener una concentración final del 1% (p/v). En forma paralela, pocillos con células HL-1 no infectadas fueron tratadas tal como se describió para los cultivos de células infectadas.

La lectura de los resultados fue realizada en un citómetro de flujo FACSAria (BD Biosciences, EEUU), adquiriendo por lo menos 10.000 eventos. Los datos se analizaron con el programa WinMdi (versión 2.9).

p) Determinación del glicofenotipo de los tripomastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuén y Brazil - Caracterización del glicofenotipo de tripomastigotes de la cepa Tulahuén y Brazil por citometría de flujo

Se tomaron 200  $\mu\text{l}$  de medio RPMI conteniendo  $2,5 \times 10^5$  tripomastigotes de cultivo, provenientes del cultivo de células VERO infectadas con ambas cepas de *T. cruzi*. El medio se centrifugó durante 5 min a 5.000 rpm, y el sedimento con los parásitos se lavó 2 veces con

PBS-BSA 1% frío. Luego, los tripomastigotes se resuspendieron en solución de lectina-BSA 1% con las siguientes lectinas biotiniladas: PNA, SNA, HPA, LEL, PHA-L, MAL II y con Gal-1-FITC, en las concentraciones indicadas en la Tabla 1, por 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Concluido este paso, los parásitos se lavaron 2 veces con solución de lectinas-BSA 1%, y se incubaron con Streptavidina conjugada a FITC (BD Pharmigen, EEUU) en solución de lectinas-BSA 1% 1 h a temperatura ambiente. Los parásitos se resuspendieron en PBS y se les agregó PFA 4% en PBS gota a gota hasta obtener una concentración final del 1% (p/v). La lectura de los resultados se realizó en un citómetro de flujo FACSAria (BD Biosciences, EEUU), luego de la adquisición de aproximadamente 10.000 eventos. Los datos se analizaron con el programa WinMdi (versión 2.9).

Los parámetros analizados fueron el porcentaje de parásitos con una fluorescencia mayor al umbral de positividad, y el índice de fluorescencia específico (SFI), calculado como el cociente entre la fluorescencia media del tubo marcado con la lectina incógnita y su control sin lectina marcado con Streptavidina-FITC (obtenido bajo las mismas condiciones que el tubo incógnita).

#### - Unión de Gal-1 a tripomastigotes por fluorescencia indirecta

Se trataron cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro con poli-lisina 10 mM, durante 30 min. Luego se lavaron con agua destilada, y se dejaron secar. Posteriormente, se tomaron 200 µl de medio RPMI conteniendo  $2,5 \times 10^5$  tripomastigotes de las cepas Brazil o Tulahuén, obtenidos del cultivo de células VERO infectadas. Los parásitos se dejaron asentar durante 30 min, y luego fueron fijados con PFA 2% durante 18 hs. Los cubreobjetos con parásitos fijados se lavaron 2 veces PBS, y luego se los incubó durante 5 min en PBS-glicina 0,02 M (pH 7,4) para inactivar los restos de PFA libre. Luego de incubar con PBS-BSA 2% durante toda la noche a 4°C, se procedió a la marcación con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Tc13 (dilución 1/200 en PBS-BSA 1%), y posteriormente con un anticuerpo anti-Ig de conejo conjugado a Cy3 (dilución 1/200 en PBS-BSA 1%) en presencia de rGal-1(20 µg/ml). Luego de 2 lavados, los parásitos fueron incubados con un anticuerpo policlonal de ratón anti-Gal-1 conjugado a Alexa488 (dilución 1/200 en PBS-BSA 1%). El tiempo de incubación de los diferentes anticuerpos fue de 1 h a temperatura ambiente, en oscuridad. Entre paso y paso se hicieron 2 lavados con PBS y se dejó incubando durante 5 min cada vez con agitación suave.

El montaje se realizó utilizando el medio Vectashield que contenía DAPI (Vector Labs, Reino Unido). La visualización se realizó en un microscopio de fluorescencia Olympus BX41

a 1000 aumentos. Las fotos fueron tomadas al azar usando una cámara digital Olympus DP71 acoplada al microscopio.

q) Ensayos *in vivo*

- Protocolo de infección

Se separaron ratones C57Bl/6 de tipo salvaje y C57Bl/6-*Lgals1*<sup>-/-</sup> de 8 semanas de edad en 12 grupos experimentales (Tabla 2). Se inocularon por vía intraperitoneal con 200 µl de RPMI conteniendo 2.500 tripomastigotes sanguíneos de las cepas Brazil o Tulahuén, obtenidos a partir de ratones BALB/c. En cada experimento, se utilizaron en forma paralela un grupo de animales salvajes y *Lgals1*<sup>-/-</sup> machos y hembras a los cuales se les inyectaron 200 µl de medio RPMI, y que constituyeron el grupo de ratones control.

Grupo	Género	Genotipo de ratones	Cepa de <i>T. cruzi</i> utilizada para la infección
1	Machos	WT	Tulahuén
2	Machos	<i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	Tulahuén
3	Hembras	WT	Tulahuén
4	Hembras	<i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	Tulahuén
5	Machos	WT	Brazil
6	Machos	<i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	Brazil
7	Hembras	WT	Brazil
8	Hembras	<i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	Brazil
9	Machos	WT	Control
10	Machos	<i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	Control
11	Hembras	WT	Control
12	Hembras	<i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	Control

Tabla 2. Grupos experimentales

- Determinación de la parasitemia

Se extrajo sangre venosa de la cola de los ratones infectados a diferentes días post-infección, según corresponda a la cepa Tulahuén o Brazil (ver Resultados). Aproximadamente con 5 µl de la sangre extraída en micropipeta se hizo un extendido entre cubreobjetos y portaobjetos.

Se contaron los parásitos observados en 50 campos seleccionados al azar en un microscopio óptico a 400X.

- Determinación de la sobrevida

Durante todo el protocolo, y diariamente, se llevaron registros de la ocurrencia de muertes de animales en cada grupo.

- Extracción de órganos

La extracción del corazón y músculo esquelético se realizó al día 19 post-infección en los ratones infectados con la cepa Tulahuén (pico de la parasitemia) y al día 120 en los animales infectados con tripomastigotes de la cepa Brazil.

Para proceder a la extracción de los órganos, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se les hizo una incisión en el pecho, y se les extrajo el corazón, el cual se separó en dos mitades, una para fijar con formol 10% en PBS durante al menos 72 h, y otra parte para realizar un congelamiento rápido en nitrógeno líquido, y posteriormente conservar a -80°C. El mismo procedimiento se utilizó para el músculo esquelético obtenido de las patas traseras de los animales. Los órganos en formol se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su posterior procesamiento.

- Cortes histológicos y tinción con Hematoxilina-eosina

Las muestras en formol fueron procesadas por el personal técnico del Laboratorio Uriburu (J.E. Uriburu 1044, PB "B"). Brevemente, los tejidos fijados fueron deshidratados por pasajes sucesivos en soluciones de concentración creciente de etanol (70°, 96° y etanol absoluto), tratados con xilol, y luego de embebidas se incluyeron en parafina. Se hicieron cortes seriados de  $\mu\text{m}$  de espesor utilizando un micrótopo Minot, y se tiñeron con solución de Hematoxilina y Eosina. Para esto, las muestras se sumergieron en xilol, y se rehidrataron por pasajes en alcoholes de concentración decreciente (etanol absoluto, 96° y 70°), y luego en agua. Se sumergieron las muestras en solución de hematoxilina por 10 min y se lavaron con agua; luego se pasaron por alcohol levemente acidificado y se sumergieron en eosina por 30 segundos. Una vez realizada la tinción, los preparados se deshidrataron nuevamente, se sumergieron en xilol y se montaron entre portaobjetos y cubreobjetos en bálsamo de Canadá. Las muestras teñidas se analizaron por microscopía óptica en un microscopio Nikon Eclipse 200, teniendo en cuenta los siguientes parámetros: índice de inflamación, índice de necrosis,

y densidad parasitaria (número de nidos de parásitos/mm<sup>3</sup> de tejido). Las fotos de cortes histológicos se tomaron con una cámara digital Olympus DP71, acoplada al microscopio.

Las áreas de los tejidos se determinaron a partir de las fotos de cada una de las secciones analizadas (100x), mediante el programa Image J (Versión 1.41, NIH, EEUU).

#### - Electrocardiograma

Los electrocardiogramas de los ratones sin infectar e infectados con *T. cruzi*, cepa Brazil, se realizaron en el día 35 y 95 post-infección. Los animales fueron anestesiados con avertina (2,2,2-tribromo etanol, Sigma-Aldrich, EEUU), a una dosis de 400 mg/Kg de peso por vía intraperitoneal. Los registros electrocardiográficos se realizaron entre los 10 y los 15 min luego de la inyección del anestésico, en un equipo Fukuda-Denshi Fx-2111 (Japón). Se usaron las derivaciones I, II, III, AVR, AVL y AVF) a 50 mm/s de velocidad de papel y a 20 mm/mV de amplitud y se evaluaron los siguientes parámetros: duración y amplitud de la onda P, duración y amplitud del intervalo QRS, duración del intervalo P-R, frecuencia cardíaca, así como arritmias y alteraciones en la conducción y despolarización.

#### r) Análisis estadístico

Se utilizó el Test no paramétrico de Mann-Whitney de una cola para comparar los diferentes parámetros en los ensayos *in vivo* (análisis de cortes histológicos, parasitemias). Para el análisis de los registros electrocardiográficos y para la determinación de Gal-1 por ELISA en suero de pacientes con Enfermedad de Chagas e individuos sanos, se utilizó el Test no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido el Test de Dunns y, las curvas de supervivencia se analizaron por el Test de Log-rank. Los datos de expresión de Gal-1 obtenidos por ensayos de inmunotransferencia se analizaron con el Test *t* de Student. El resto de los ensayos fueron analizados mediante análisis de la Varianza (ANOVA) de una vía, seguido del Test *a posteriori* de Tukey para comparación de múltiples grupos. En los experimentos de glicofenotipo, se utilizó el test *a posteriori* de Dunnet para comparación de los grupos respecto del control.

Los análisis se efectuaron con el programa GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software Inc.). Se consideró un  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

## Resultados

### Determinación de la concentración de Gal-1 en suero de pacientes con Enfermedad de Chagas-Mazza crónica

Tal como se mencionó en la Introducción de esta Tesis, trabajos previos reportaron el incremento de Gal-1 en biopsias de tejido cardiaco de pacientes con CCC, así como también un incremento en la expresión de esta lectina en linfocitos B y macrófagos luego de la infección experimental con *T. cruzi*. (Giordanengo y col. 2001; Zúñiga y col. 2001a; Zúñiga y col. 2001b). Con el propósito de determinar si este aumento se reflejaba en la cantidad de Gal-1 sérica, se midió su concentración en el suero de pacientes con la enfermedad de Chagas-Mazza crónico, tanto asintomáticos como con cardiopatía chagásica y de individuos sanos, por ELISA (Figura 1).

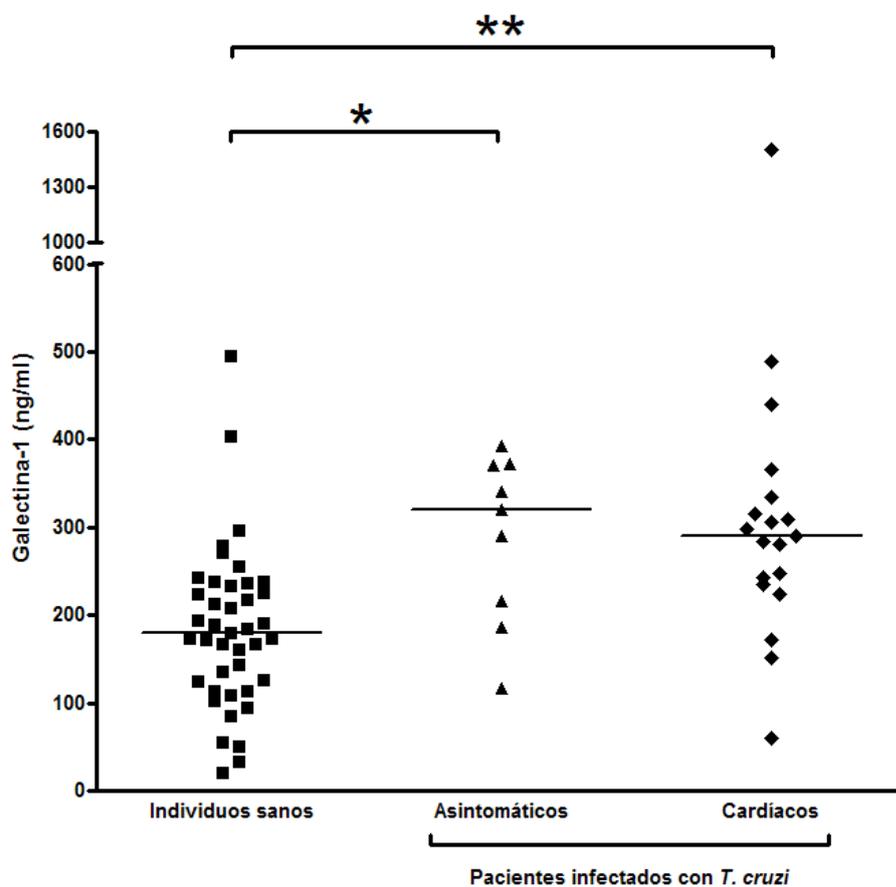


Figura 1. Concentración de Gal-1 en suero de pacientes con Enfermedad de Chagas-Mazza crónica, determinados por ELISA. La diferencia estadística entre los grupos se analizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido del test *a posteriori* de Dunns. \* $P < 0,01$ ; \*\* $P < 0,001$ .

Los resultados mostraron un aumento significativo de la concentración de Gal-1 sérica en los pacientes con Enfermedad de Chagas-Mazza crónica, en comparación con los valores detectados en suero de individuos no infectados. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la concentración de Gal-1 entre sueros de pacientes crónicos asintomáticos y sueros de pacientes con sintomatología cardíaca. En conjunto, los resultados mostraron que la infección crónica por *T. cruzi* cursa con un aumento de esta lectina en suero, independientemente de que cursen con sintomatología. Por lo tanto, y a diferencia de los que se postula para Gal-3 (Lok y col. 2009; De Boer y col. 2010; De Boer y col. 2011), nuestros resultados sugieren que Gal-1 no sería una molécula útil como marcador de progresión de la patología cardíaca en la Enfermedad de Chagas-Mazza crónica.

### Expresión de Gal-1 en células HL-1

En función de los resultados obtenidos, decidimos estudiar si el aumento de Gal-1 observado en el suero de pacientes con Enfermedad de Chagas-Mazza estaba relacionado con un incremento en la expresión de esta lectina en cardiocitos infectados. Para este fin, se utilizó la línea celular HL-1 derivada de un tumor atrial de corazón de ratón adulto, y que mantiene las características estructurales y fisiológicas de células cardíacas adultas, y tripomastigotes de las cepas Tulahuén y Brazil, pertenecientes a dos UDT (unidades discretas de tipificación) diferentes. La cepa Brazil fue tipificada como UDT I, mientras que la cepa Tulahuén stock Tul-2 fue asignada a la UDT VI. Se analizaron los niveles de expresión de Gal-1 en las células HL-1 luego de 2 y 5 días post-infección con tripomastigotes de ambas cepas, con el propósito de determinar el efecto en etapas tempranas y tardías de la infección *in vitro*.

Los resultados obtenidos a partir de la técnica de RT q-PCR, no evidenciaron diferencias significativas en la expresión del ARNm de Gal-1 a los 2 ni a los 5 días post-infección, tanto para el cultivo infectado con la cepa Tulahuén como con la cepa Brazil (Figura 2).

Al analizar la concentración de Gal-1 intracelular por *Western Blot*, tampoco se detectó un aumento significativo de esta lectina en las células infectadas con ninguna de las dos cepas de *T. cruzi*. Sin embargo, en el caso de los cultivos infectados con Brazil a los dos días post-infección hubo una disminución en su expresión (Figura 3A y 3B).

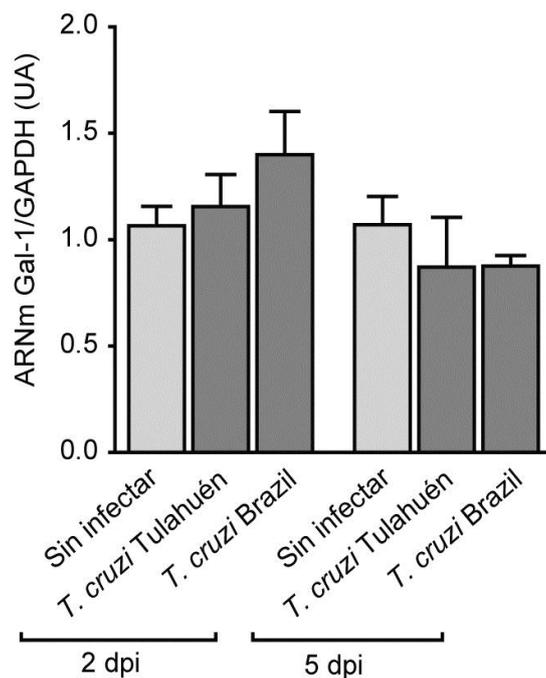
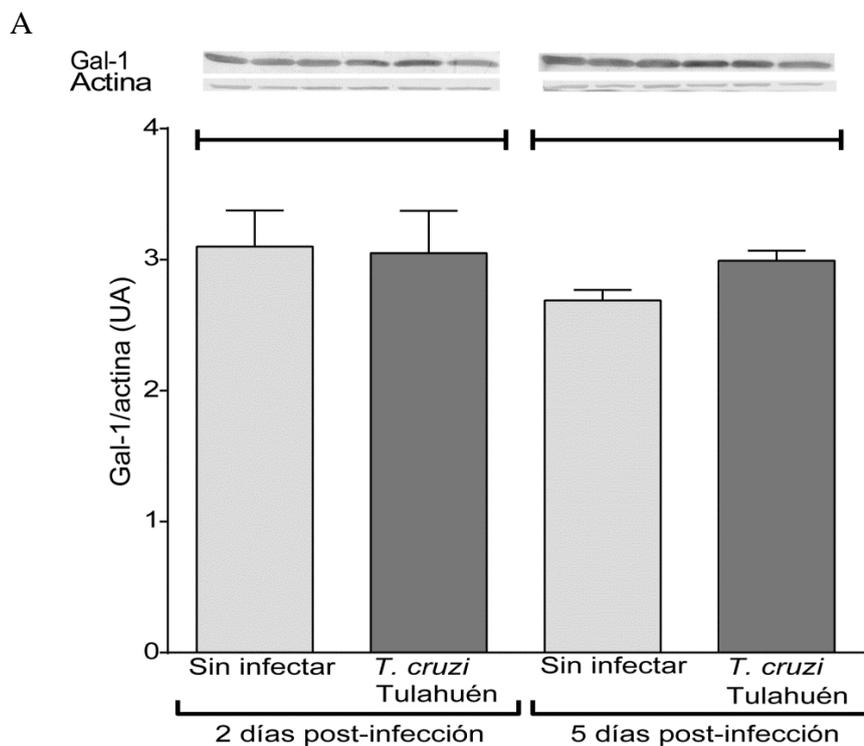


Figura 2. Análisis de la expresión del gen *Lgals1* en cultivos infectados y sin infectar, por RT q-PCR. Los resultados se expresaron como concentración relativa del ARNm de Gal-1 respecto del ARNm del gen de mantenimiento endógeno GAPDH. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. La diferencia estadística entre los grupos se analizó con el test de ANOVA de una vía. Dpi: días post-infección.



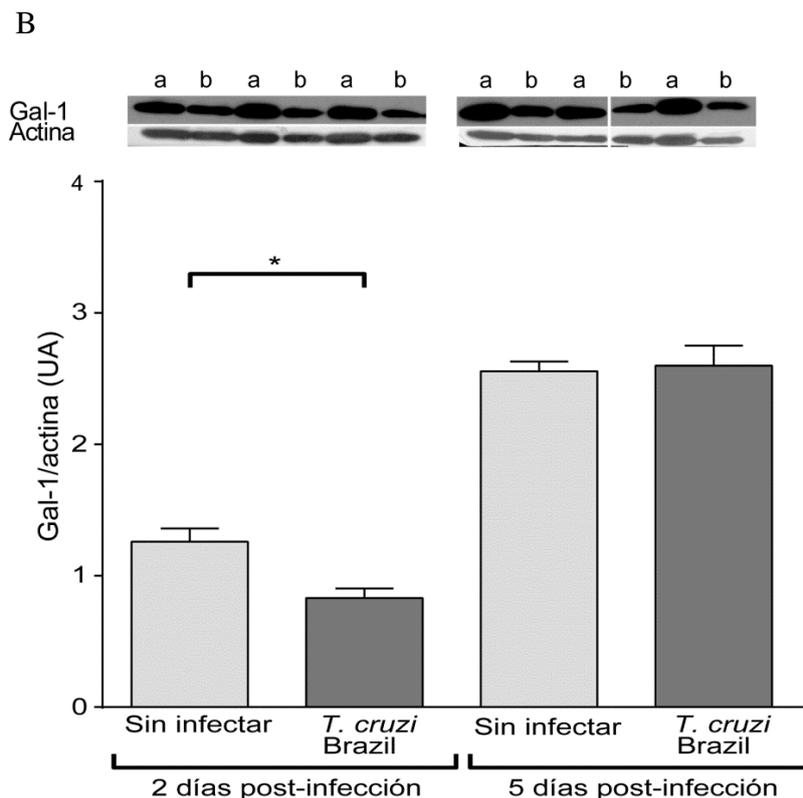


Figura 3. Análisis de la expresión de Gal-1 en cultivos infectados y sin infectar, determinada por *Western blot*. Los resultados se graficaron como expresión relativa de Gal-1 respecto del gen normalizador (actina), en cultivos infectados con *T. cruzi* a los 2 días y a los 5 días post-infección. A) Células infectadas con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, B) Células infectadas con la cepa Brazil de *T. cruzi*. En la parte superior de los gráficos se muestran las bandas específicas de Gal-1 y actina; las letras a y b de la Parte B de la Figura se refieren a las réplicas biológicas de cultivos de las células HL-1 lisadas sin infectar (a), e infectadas con *T. cruzi* (b). La semi-cuantificación de Gal-1 se determinó por densitometría. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La diferencia estadística entre los grupos se determinó utilizando el test *t* de Student. \* $P < 0,05$ .

Dado que Gal-1 es una proteína que se secreta al medio extracelular, se analizó la concentración de Gal-1 en los sobrenadantes de cultivo a los 2 y 5 días post-infección, por ELISA. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en la cantidad de Gal-1 entre cultivos de HL-1 infectadas y sin infectar a los 2 días post-infección. Sin embargo, a los 5 días post-infección, los cultivos infectados por cada una de las cepas presentaron una mayor concentración de Gal-1 en el sobrenadante respecto del cultivo sin infectar, aun cuando no pudo observarse un aumento en la expresión por parte de las células HL-1 (Figura 4).

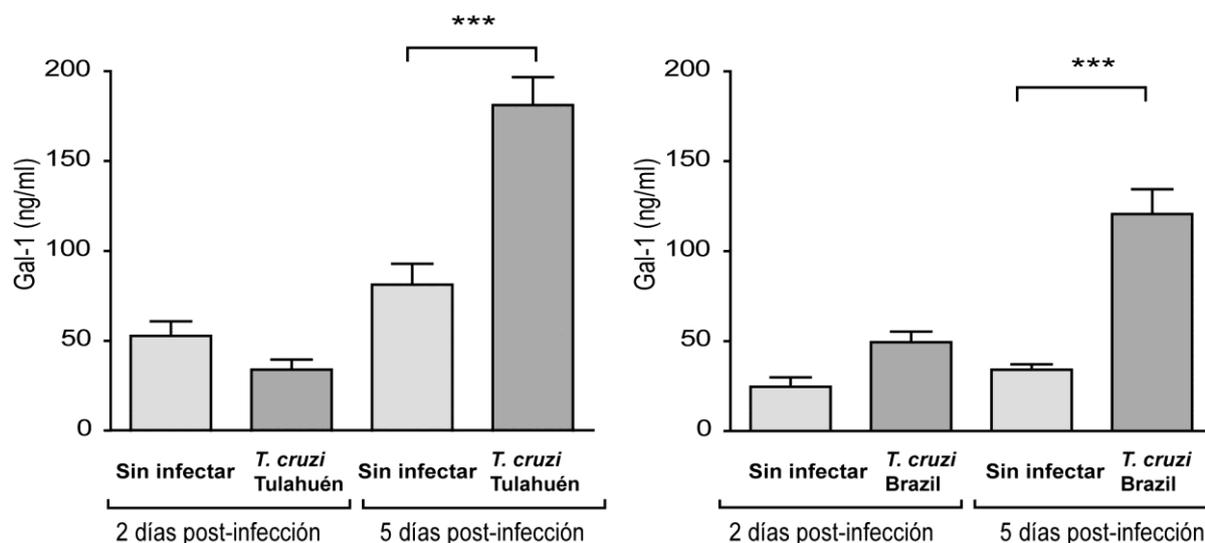


Figura 4. Concentración de Gal-1 en sobrenadantes de cultivo infectados con Tulahuén y con Brazil. Los datos corresponden a un experimento representativo de un total de dos determinaciones independientes. Los valores representan las medias  $\pm$  SEM obtenidas a partir de 4 réplicas dentro del mismo ensayo. La diferencia estadística entre los grupos se analizó con el test de ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey. \*\*\*  $P < 0,001$

El aumento de la concentración de Gal-1 en el sobrenadante de cultivo, podría explicarse a partir de la secreción de esta lectina, o bien a una liberación secundaria resultado de la lisis de las células infectadas. Dado que *T. cruzi* provoca la ruptura de la célula hospedadora, se analizó la actividad de la enzima endógena lactato deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes de cultivo a los 2 y a los 5 días post-infección (Figura 5).

Los resultados mostraron que sólo a los 5 días post-infección, se observó un aumento significativo de la actividad de LDH en concordancia con el incremento de Gal-1 observado en el sobrenadante (Figuras 4 y 5). Por otro lado, en la Figura 6 se muestra que cuando la infección de las células cursó sin aumento de Gal-1, paralelamente, tampoco se observó aumento de la actividad de LDH, y esto ocurrió para ambas cepas evaluadas (Figura 6). A pesar que no es posible descartar otras vías de secreción, el conjunto de los resultados sugiere que el aumento de Gal-1 en el sobrenadante proviene de la lisis de las células HL-1 producida por la infección con el parásito.

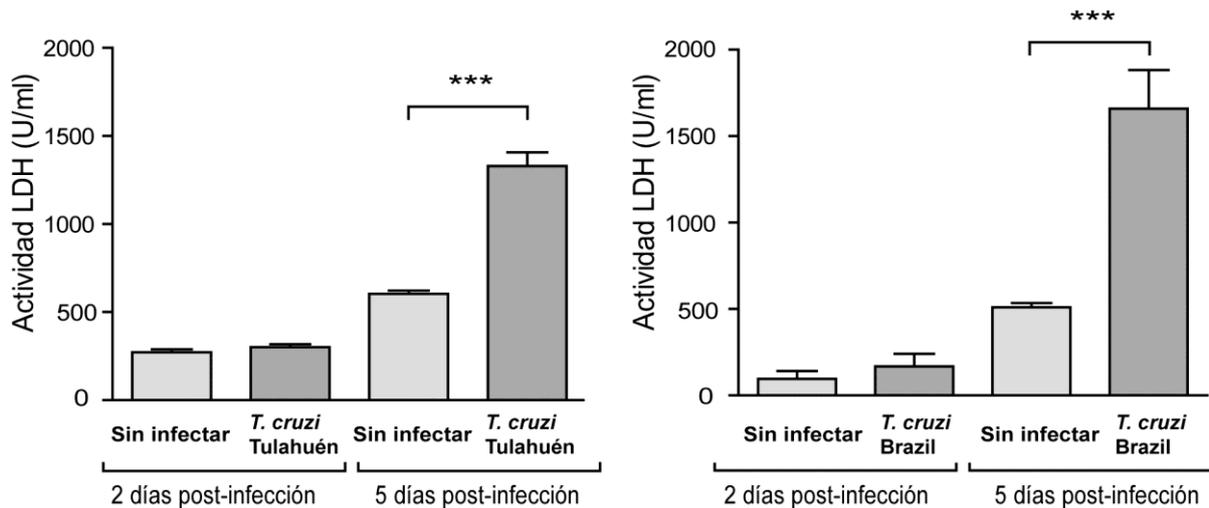


Figura 5. Actividad de LDH de cultivos infectados con *T. cruzi*, cepas Tulahuén y con Brazil. Los datos corresponden a un experimento representativo de un total de dos determinaciones independientes. Los valores representan las medias  $\pm$  SEM obtenidas a partir de 4 réplicas dentro del mismo ensayo. La diferencia estadística entre los grupos se analizó con el test de ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey. \*\*\*  $P < 0,001$

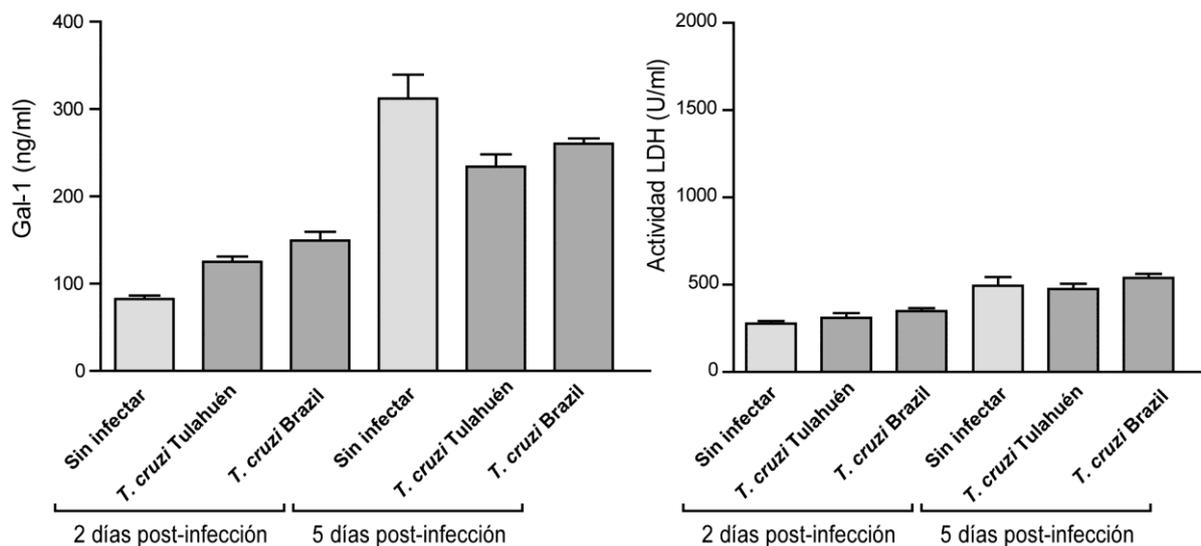


Figura 6. Infección en ausencia de secreción de Gal-1 y de aumento de la actividad LDH de cultivos infectados con tripomastigotes de las cepas Tulahuén y Brazil. Las condiciones experimentales fueron iguales que para el resto de las infecciones. Los gráficos representan las medias  $\pm$  SEM de un único experimento, con 3-4 réplicas biológicas. La diferencia entre los grupos se analizó con el test de ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey.

Dado que Gal-3 ha sido postulada como un buen biomarcador de daño cardíaco y fibrosis en pacientes, con particular valor pronóstico en algunos tipos de insuficiencia cardíaca (Lok y col. 2009; De Boer y col. 2010; De Boer y col. 2011), se analizó su expresión en las células infectadas con las cepas Tulahuén y Brazil de *T. cruzi*, tanto por RT q-PCR como por *Western blot*

A nivel transcripcional, no se observaron diferencias significativas en la concentración relativa del ARNm del Gal-3 a los 2, ni a los 5 días post-infección. Sin embargo, a los 2 días post-infección pudo observarse una tendencia no significativa de aumento en la expresión de Gal-3 en las células infectadas con la cepa Brazil (Figura 7).

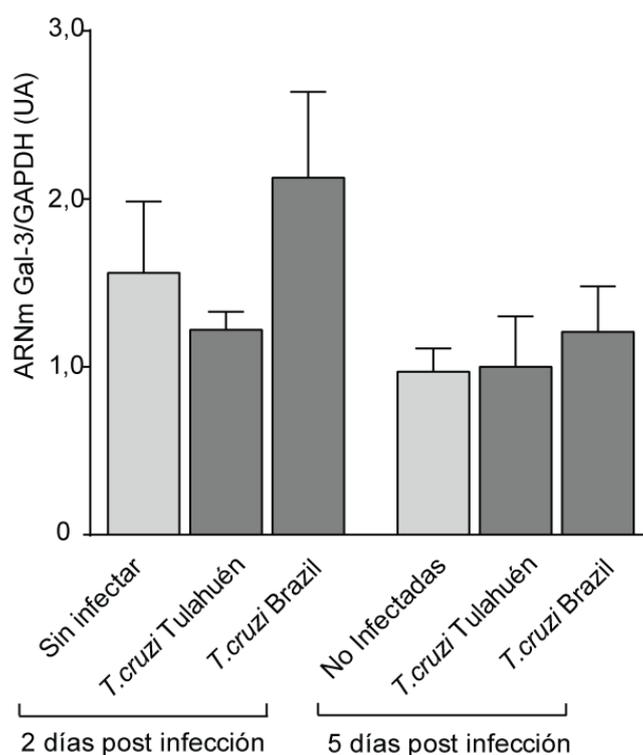


Figura 7. Análisis de la expresión del gen *Lgals3* en cultivos infectados y sin infectar, por RT q-PCR. Los resultados se expresaron como concentración relativa del ARNm de Gal-3 respecto del ARNm del gen de mantenimiento endógeno GAPDH. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. La diferencia estadística entre los grupos se analizó con el test de ANOVA de una vía.

Por otro lado, en la semi-cuantificación de Gal-3 por *Western blot*, se observó un aumento significativo en la concentración relativa de la proteína en células HL-1 infectadas con la cepa Brazil, que no se observó al infectar con tripomastigotes de la cepa Tulahuén (Figura 8).

El hecho de que el aumento en la concentración de Gal-3 tenga lugar con una de las cepas, indica que no sería un fenómeno general que ocurre en la infección experimental por *T. cruzi*, sino que podría estar relacionado con un determinado linaje de *T. cruzi*, tal como se demuestra con las cepas utilizadas en este trabajo de Tesis.

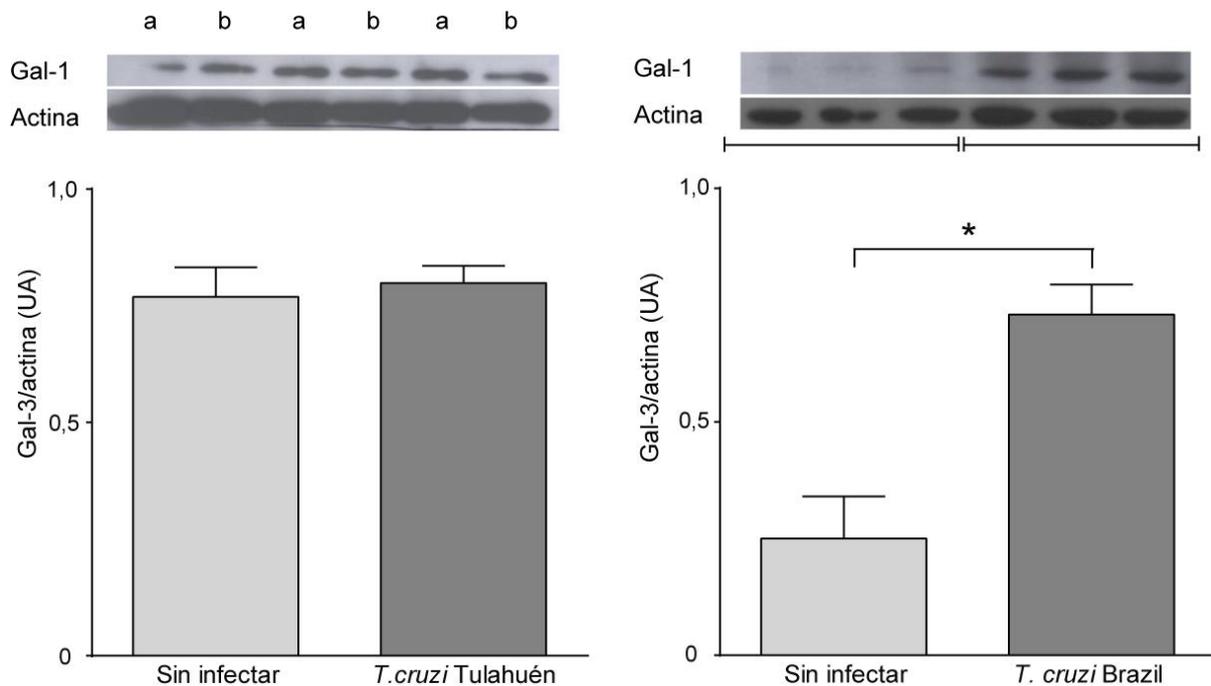


Figura 8. Análisis de la expresión de Gal-3 en cultivos infectados y sin infectar, determinada por *Western blot*. Los resultados se graficaron como la expresión relativa de Gal-3 respecto de actina, en cultivos infectados con *T. cruzi* a los 5 días post-infección. En la parte superior de la Figura, se muestran las bandas específicas de Gal-3 y actina de tres experimentos independientes; las calles marcadas con la letra (a) corresponden a células HL-1 sin infectar y las calles marcadas con b a las células infectadas con *T. cruzi*. La semi-cuantificación de Gal-3 se determinó por densitometría. La diferencia estadística entre los grupos se analizó mediante el test *t* de Student. \*P<0,05.

### Efecto de Gal-1 sobre el curso de la infección por *T. cruzi* en células HL-1

Considerando que Gal-1 es una proteína que, en muchos tipos celulares, induce apoptosis de manera dependiente de la concentración (Camby y col. 2006; Toscano y col. 2007), se decidió determinar su efecto sobre las células cardíacas HL-1 sin infectar. Para ello, se incubaron las células con distintas concentraciones de Gal-1 recombinante (rGal-1) y luego se determinó el número de células Anexina V<sup>+</sup> por citometría de flujo. Los resultados mostraron que rGal-1 en concentraciones de 100 y 200 µg/ml produce apoptosis temprana de las células HL-1, mientras que a 5, 10 y 50 µg/ml, el porcentaje de células en apoptosis temprana fue similar al porcentaje detectado en ausencia de rGal-1 (Figura 9). Por otro lado, la lactosa *per se* o agregada simultáneamente con rGal-1 (50 µg/ml) no logró inducir apoptosis de células cardíacas. Cabe señalar que la lactosa se utiliza para determinar si el efecto de Gal-1 se debe a la interacción con los glicoconjugados presentes en la superficie de las células, ya que este disacárido compite con la unión lectina-polilactosamina.

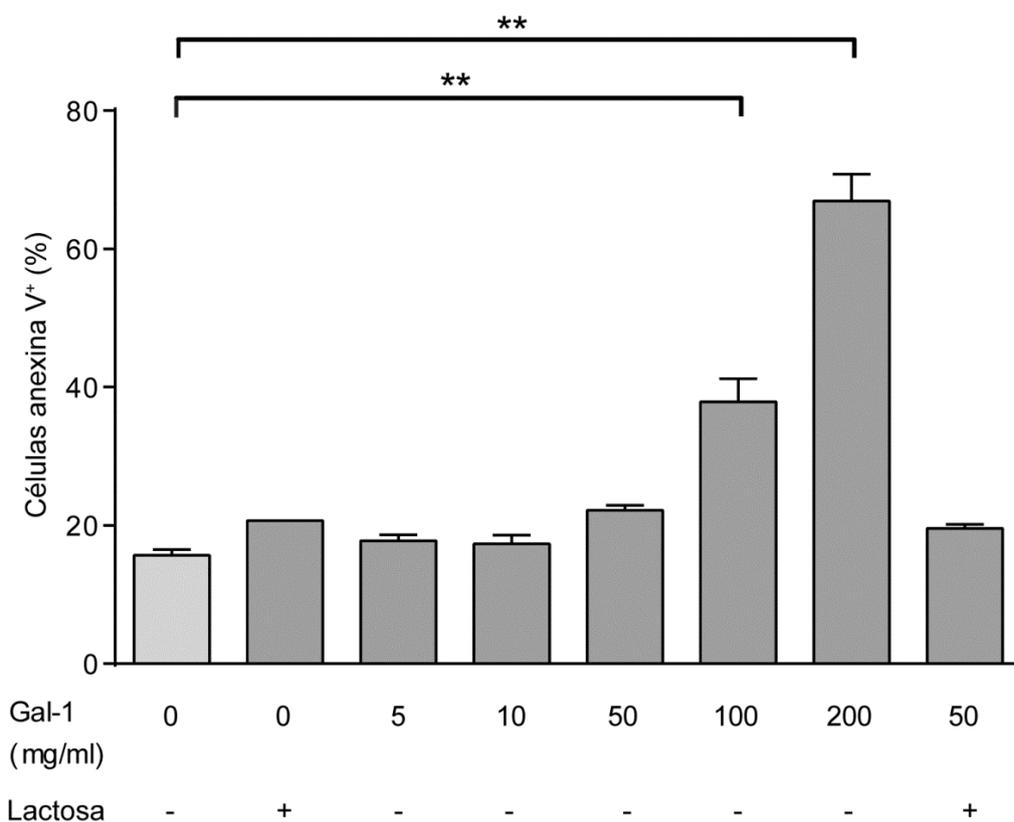


Figura 9. Apoptosis de las células HL-1 inducida por diferentes concentraciones de Gal-1. El porcentaje de células apoptóticas se determinó por el ensayo de anexina V-FITC y posterior análisis por citometría de flujo. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de 3 replicados por tratamiento de un experimento representativo (n=2). La diferencia estadística se determinó por el test de ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. \*\* P<0,01

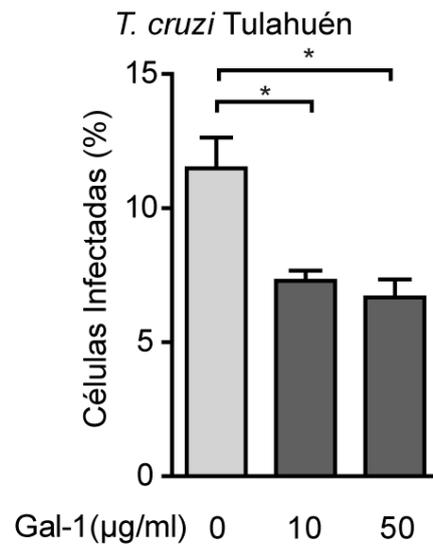
En función de los resultados obtenidos, se decidió utilizar rGal-1 en concentraciones de 10 µg/ml (0,7 µM) y de 50 µg/ml (3,5 µM) en los ensayos de determinación del efecto de Gal-1 sobre la infección de HL-1 con tripomastigotes de las cepas Brazil y Tulahuén, así como también en los de apoptosis inducida por *T. cruzi*.

Una vez elegidas las concentraciones de Gal-1 que no inducen apoptosis de las células HL-1 y sabiendo que se libera al medio por ruptura celular, se decidió evaluar si Gal-1 modulaba la infección de las células cardiacas por *T. cruzi*. Para ello, se cultivaron las células HL-1 sobre vidrios estériles gelatinizados, y luego de incubarlas con rGal-1 en las concentraciones elegidas a partir del ensayo de apoptosis (10 y 50 µg/ml), se infectaron con tripomastigotes de la cepa Brazil y Tulahuén durante 4 días. La elección de tiempo de análisis 4 días post infección se basó no sólo en el hecho que ese tiempo resultaba suficiente para observar globalmente todos los pasos de la infección (invasión, diferenciación, replicación, ruptura de la célula y re-invasión), sino también en que se observó que a tiempos mayores, la mayoría de las células se lisaban por la presencia del parásito y no habría sido posible determinar el número de amastigotes en forma correcta y reproducible. El número de células infectadas se determinó por inmunofluorescencia indirecta, utilizando como primer anticuerpo, un suero policlonal de ratón crónicamente infectado con *T. cruzi*, y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor 488.

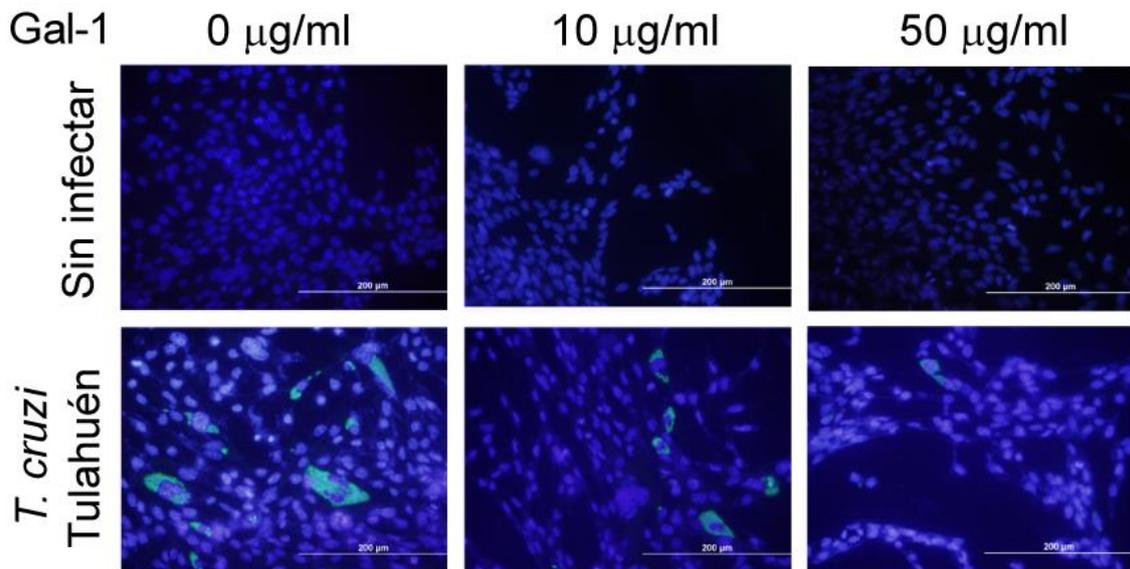
En la Figura 10A y 10B, rGal-1 disminuyó el número de células infectadas con *T. cruzi*, cepa Tulahuén tanto a 10 como a 50 µg/ml. Similares resultados se obtuvieron con la cepa Brazil, aunque hubo una tendencia, no significativa, de disminución en el porcentaje de células infectadas, al utilizar 10 µg/ml de rGal-1 (Figura 10C y 10D).

Tal como se mencionó en párrafos anteriores, un ciclo de infección completo, que incluye invasión, diferenciación, replicación, ruptura de la célula y re-invasión, supone un tiempo superior a 48 h luego de la infección (De Souza, 2002; Alves y col. 2007; Epting y col. 2010). Por este motivo, y con el propósito de determinar el efecto de Gal-1 principalmente sobre el evento de invasión celular, se realizaron experimentos similares a los de la Figura 10, pero analizando los porcentajes de infección de las células HL-1 a los 2 días post infección.

A



B)



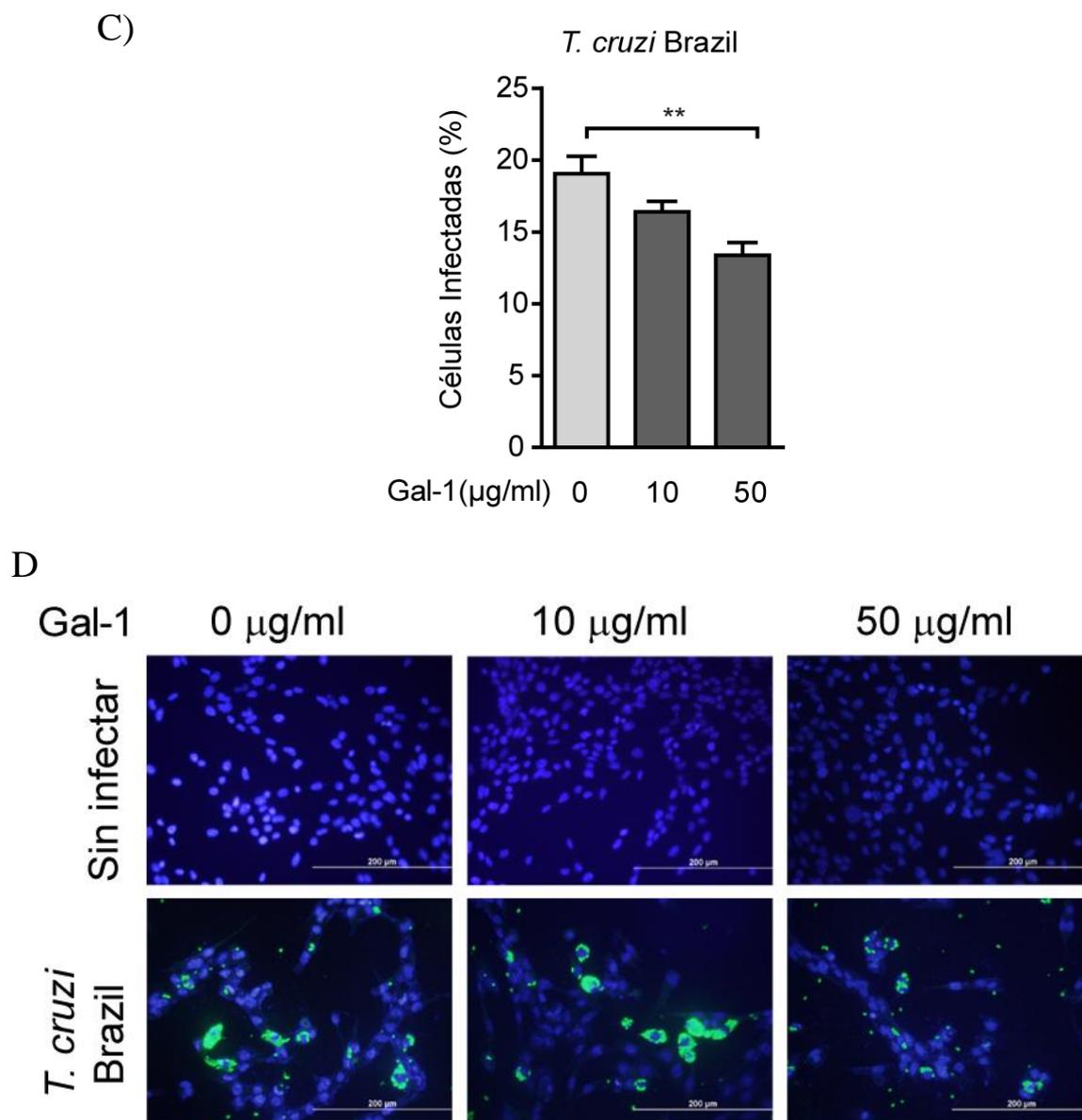


Figura 10. Efecto de Gal-1 sobre el curso de la infección por *T. cruzi* en células HL-1. Porcentaje de células infectadas con las cepas Tulahuén (A) y Brazil de *T. cruzi* (C) para cada uno de los tratamientos con Gal-1 (0, 10 y 50 µg/ml). La significancia estadística entre grupos se determinó utilizando ANOVA de una vía, seguido de test de Tukey. Estos resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Los valores representados en los gráficos corresponden a la media  $\pm$  SEM de 3-5 replicados por tratamiento. \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$ . B y D) Imágenes de un campo representativo de dichos tratamientos y de sus respectivos controles sin infectar revelados por IFI, para las cepas Tulahuén (B) y Brazil (D), respectivamente (200X).

Es importante remarcar que en estos ensayos, las células permanecieron en presencia de los tripomastigotes por 18 hs, con el propósito de permitir una mayor interacción parásito-célula. De esta manera, se pudo aumentar el número de células infectadas para estas condiciones experimentales, lo que implicaba una mayor sensibilidad para detectar cambios pequeños en los porcentajes de infección.

Además, se incluyeron controles con lactosa para determinar si los efectos observados en la pre-incubación con Gal-1 se debían a la interacción con residuos de lactosamina presentes en la membrana del parásito o de la célula cardiaca, o si el mecanismo era independiente de la unión a carbohidratos (Figura 11).

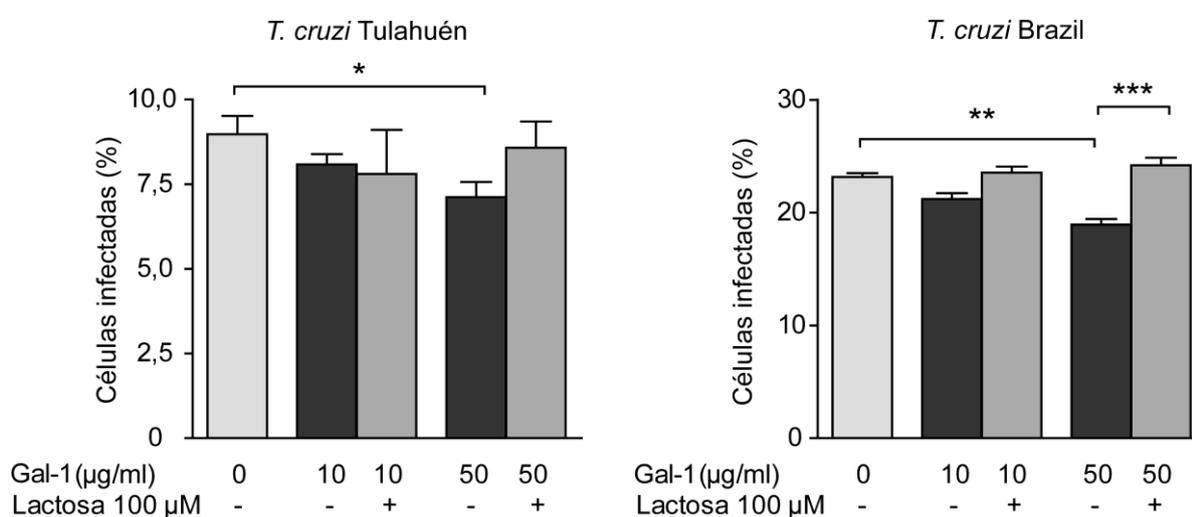


Figura 11. Efecto de Gal-1 sobre la invasión de *T. cruzi* a células HL-1. Gráficos del porcentaje de células infectadas con las cepas Tulahuén y Brazil de *T. cruzi*. La significancia estadística entre grupos se determinó utilizando ANOVA de una vía, seguido de test de Tukey. Estos resultados son representativos de 2 experimentos independientes. Los valores representados en los gráficos corresponden a la media  $\pm$  SEM de 3-5 replicados por tratamiento. \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$  \*\*\*  $P < 0,001$

Los resultados mostraron que rGal-1 en una concentración de 50 µg/ml, disminuyó la invasión de las células HL-1 por los tripomastigotes de ambas cepas (Figura 11). Este efecto se revirtió cuando las células fueron pre-tratadas con rGal-1 en presencia de lactosa para la cepa Brazil, y sólo se demostró una reversión parcial para la cepa Tulahuén. En ambos casos, rGal-1, en una concentración de 10 µg/ml indujo una disminución del porcentaje de células infectadas que no fue significativa aplicando el test *a posteriori* de Tukey.

Gal-1 es una lectina que tiene funciones duales, tanto exógenas, dependientes de su unión a carbohidratos, como endógenas, mayormente dependientes de interacciones proteína-proteína (Camby y col. 2006). Para evaluar el efecto de Gal-1 endógena, se transfectaron de manera estable cultivos celulares de la línea HL-1 con un plásmido pcDNA3.1-Gal-1 que permite la sobre-expresión de esta lectina en células eucariotas. La eficiencia de la transfección se evaluó al medir la cantidad de Gal-1 en el medio de cultivo de las células transfectadas y sin transfectar por ELISA. Los resultados mostraron un aumento de Gal-1 aproximadamente 4 a 8 veces mayor en las células HL-1 transfectadas con la construcción pcDNA3.1-Gal-1 respecto de los controles transfectados con el plásmido vacío.

Como un control adicional a la determinación del efecto de Gal-1 endógena, se evaluó si el vector pcDNA3.1 vacío (MOCK) afectaba el grado de infección en comparación con las células sin transfectar. Tal como se observa en la Figura 12, el porcentaje de células HL-1 sin transfectar infectadas con tripomastigotes de la cepa Tulahuén fue similar al porcentaje determinado para las células HL-1 transfectadas con el vector vacío.

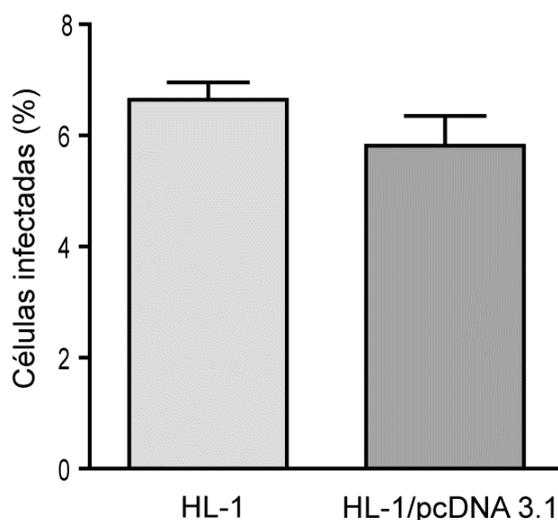


Figura 12. Invasión de *T. cruzi* cepa Tulahuén a células HL-1 sin transfectar, y a células transfectadas con el vector vacío pcDNA 3.1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM de un único experimento con 4 replicados por tratamiento. El análisis estadístico entre grupos se determinó utilizando el test *t* de Student.

La sobre-expresión de Gal-1 y la estimulación sostenida en cultivos de células HL-1 disminuyeron la invasión de células por tripomastigotes de *T. cruzi*, respecto de células que

no sobre-expresaban esta lectina, tanto para la cepa Brazil como para la cepa Tulahuén. El efecto fue revertido cuando las células fueron tratadas con lactosa, lo que indicaría un efecto dependiente de la unión carbohidratos, es decir de la fracción secretada de Gal-1 producida endógenamente (Figura 13).

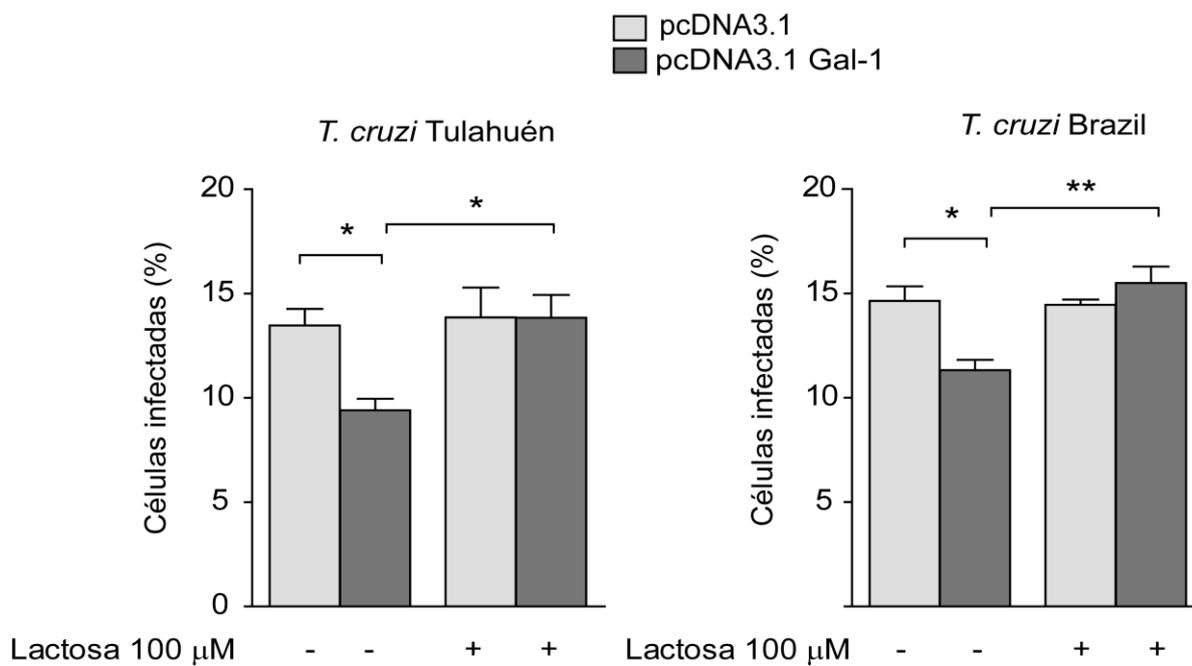


Figura 13. Invasión a las células HL-1 que sobre-expresan Gal-1 con tripomastigotes de la cepa Tulahuén, y Brazil. Estos resultados son representativos de 2 experimentos independientes. Los valores representados en los gráficos corresponden a la media  $\pm$  SEM de 3-5 replicados por tratamiento. El análisis estadístico entre grupos se determinó utilizando el test de ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey. \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$

En conjunto, los resultados sugieren que Gal-1 protege a la célula cardiaca de la infección por *T. cruzi*, independientemente del linaje, y que este efecto es mediado por la interacción de la lectina con los glicanos presentes en la superficie de la célula o del parásito, y no por la interacción de alguna proteína intracelular con esta lectina.

Con el propósito de investigar si este efecto podía estar dado por interacción directa de Gal-1 a *T. cruzi*, se incubaron los tripomastigotes de ambas cepas con esta lectina, y se midió la unión de Gal-1 por fluorescencia indirecta y citometría de flujo. En la Figura 14A se muestran los resultados correspondientes a la fluorescencia directa, donde no se observa tinción específica por unión de Gal-1 a los parásitos, mientras que un anticuerpo control

dirigido contra la proteína de superficie Tc13, seguida de un anticuerpo secundario conjugado a Cy3, mostró el patrón de marcación esperable. Resultados similares se obtuvieron por citometría de flujo, en los cuales no se observó corrimiento hacia intensidades de fluorescencia mayor cuando los parásitos fueron tratados con Gal-1-FITC, respecto de su control con Estreptavidina-FITC (Figura14B).

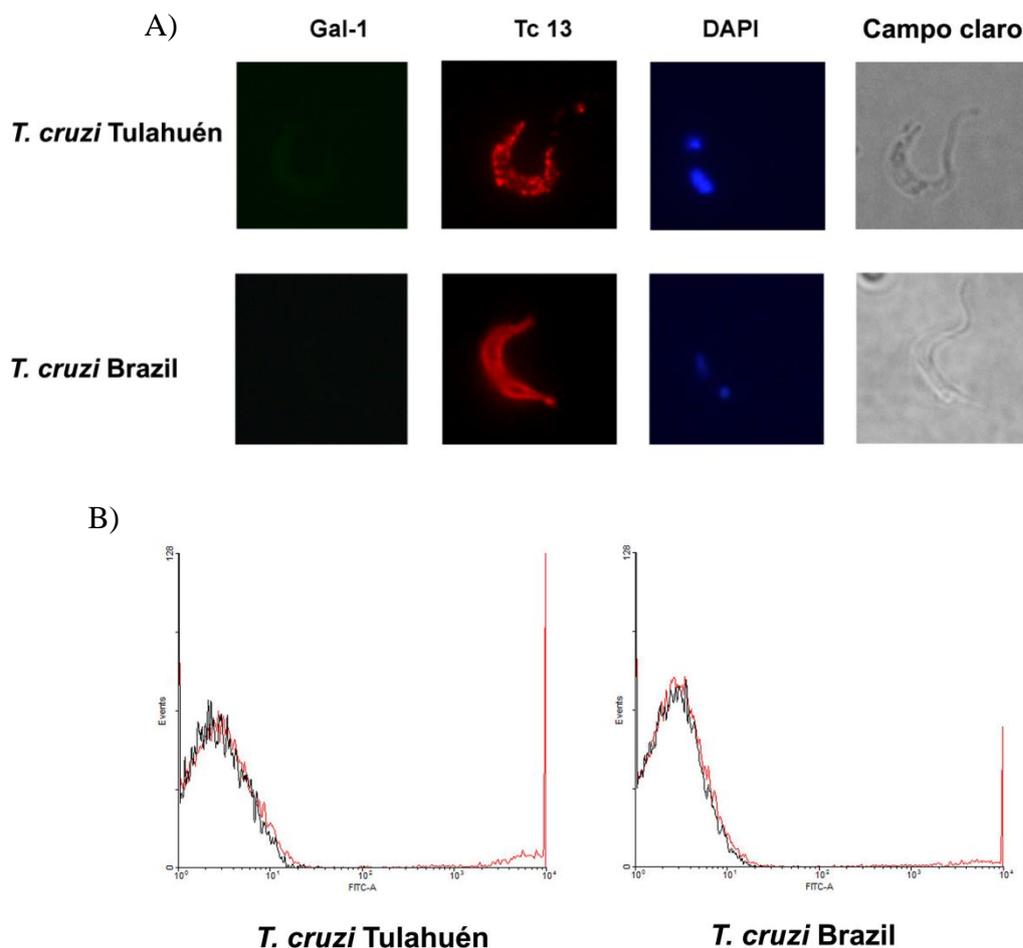


Figura 14. Unión de Gal-1 a tripomastigotes de *T. cruzi*, cepas Tulahuén y Brazil. A) Ensayo de fluorescencia correspondiente a los tripomastigotes incubados con rGal-1 (25  $\mu$ g/ml) durante 1 h, y luego revelado con un anticuerpo anti-Gal-1 marcado con Alexa Fluor 488. La tinción con un suero policlonal de conejo anti-TC13, una proteína de la superficie presente en tripomastigote, se utilizó como control positivo. B) Histogramas representativos de tripomastigotes de la cepa Tulahuén o Brazil incubados con Gal-1-FITC (25  $\mu$ g/ml). Las líneas rojas corresponden a los parásitos tratados con Gal-1-FITC, líneas negras a parásitos incubadas con estreptavidina-FITC usado como control negativo.

En conclusión, los resultados sugieren que Gal-1 protege a la célula cardíaca HL-1 de la invasión e infección por *T. cruzi*, mediante su interacción con glicanos presentes en la superficie de la célula hospedadora, e independientemente de la unión al parásito.

### Efecto de Gal-1 sobre la apoptosis de células HL-1 infectadas con *T. cruzi*

Luego de determinar el efecto protector de Gal-1 en la infección de *T. cruzi* a las células HL-1, se determinó si esta lectina podía revertir los primeros eventos en el proceso de apoptosis o exposición de fosfatidilserina, inducido por el parásito sobre las células cardíacas. Para realizar esta determinación se utilizó la técnica de anexina V acoplada a FITC, y posterior análisis por citometría de flujo. Habitualmente, la técnica de anexina V-FITC se realiza utilizando células sin fijar; sin embargo, y con el fin de salvaguardar la bioseguridad de los operadores del equipo, referidas principalmente a la formación de aerosoles durante la adquisición de los datos de las células infectadas en el citómetro, se decidió fijar las células infectadas luego de su marcación con anexina V-FITC en todos los experimentos. Por tal motivo, se evaluó en primer lugar si existían diferencias en el grado de unión de anexina V-FITC entre las células HL-1 sin fijar, y fijadas con paraformaldehído (PFA) 2%, luego de tratarlas con staurosporina, un agente pro-apoptótico sobre células cardíacas (Yue y col. 1998). Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de células anexina V positivas entre las células fijadas y sin fijar (Figura 15). De igual manera, no se encontraron diferencias cuando las células fueron adquiridas nuevamente a los 30 minutos después de la primera lectura (Figura 15).

En conclusión, la fijación no afectó la unión de anexina V si la misma se realizaba como paso final del ensayo y por lo tanto, estas condiciones resultaron ser adecuadas para la evaluación de apoptosis en los cultivos infectados.

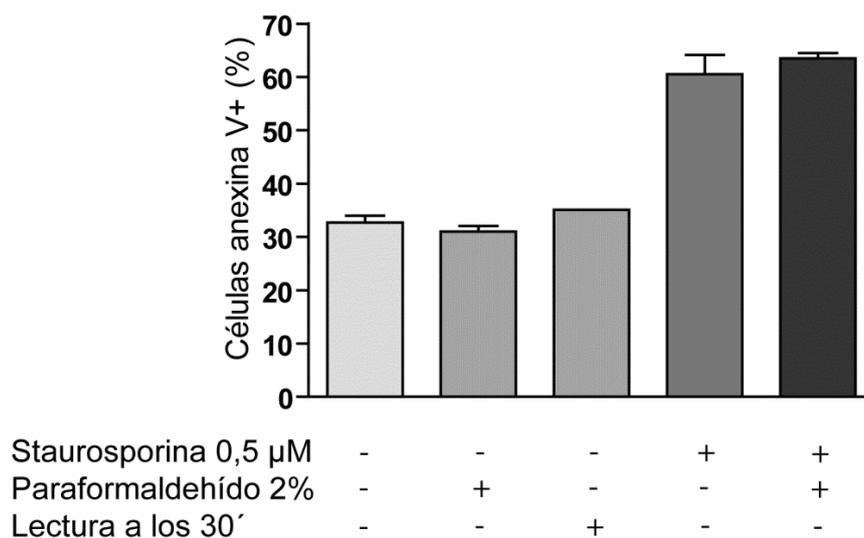


Figura 15. Efecto de la fijación con paraformaldehído sobre la determinación de las células HL-1 anexina V positivas. El análisis estadístico entre grupos sometidos al mismo tratamiento se determinó utilizando el test *t* de Student.

Así, las células HL-1 se pre-incubaron con rGal-1 durante 18 hs, y luego de infectar con tripomastigotes de las cepas Tulahuén y Brazil de *T. cruzi*, se cultivaron durante 3 días adicionales. Posteriormente, las células infectadas y sin infectar se marcaron con anexina V-FITC y se fijaron con PFA 2%.

Como se muestra en la Figura 16, la infección con tripomastigotes de ambas cepas aumentó significativamente el porcentaje de células HL-1 anexina V-FICT positivas. Cuando las células infectadas se pre-incubaron con rGal-1 a una concentración de 50 µg/ml, el porcentaje de células que expresaban fosfatidilserina en su membrana disminuyó significativamente, comparado con las células sin pre-incubar (Figura 16). Por el contrario, rGal-1 a 10 µg/ml no indujo ningún efecto. Resultados similares se obtuvieron con ambos linajes de *T. cruzi*, Además, y tal como se mostró en ensayos previos (Figura 9), el porcentaje de células anexina V-FITC positivas fue similar en células sin tratar como en aquellas tratadas con rGal-1 en ambas concentraciones utilizadas.

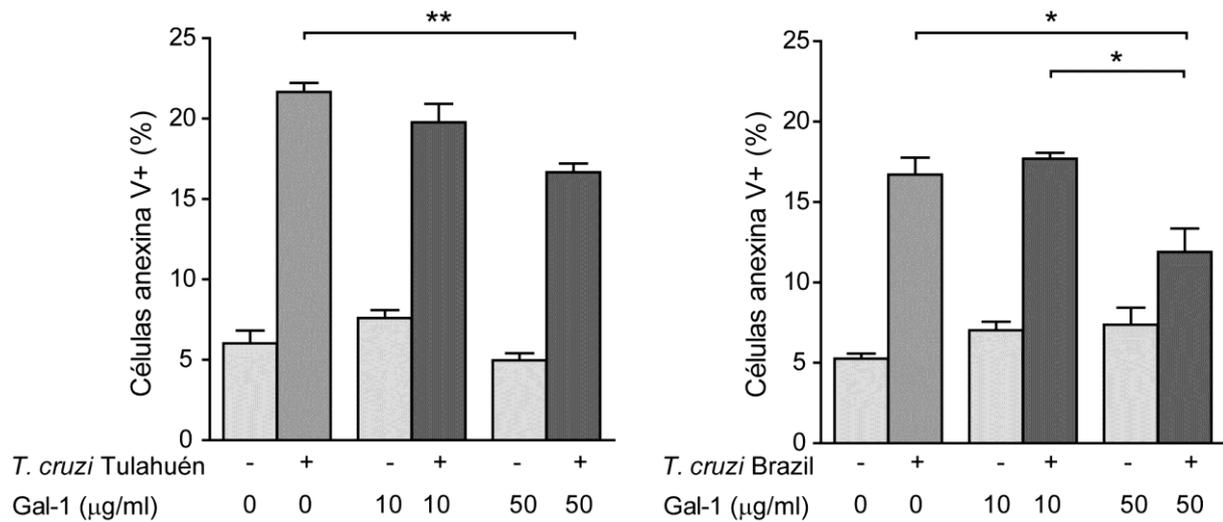


Figura 16. Efecto de Gal-1 sobre la apoptosis de las células HL-1 inducida por *T. cruzi*. Las células HL-1 se infectaron con tripomastigotes de la cepa Tulahuén, y de la cepa Brazil, y luego de 3 días se determinó apoptosis por anexina V-FITC. Estos resultados son representativos de 2 experimentos independientes. Los valores representados en los gráficos corresponden a la media  $\pm$  SEM de 3-4 replicados por tratamiento. El análisis estadístico se determinó utilizando ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey; sólo se muestran las comparaciones estadísticas entre los grupos infectados. \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$

El conjunto de resultados sugiere que Gal-1 protege a la célula cardíaca de los primeros eventos de muerte celular inducida por *T. cruzi*, independientemente del linaje infectante utilizado en este trabajo de Tesis.

## Glicofenotipo de células infectadas

Después de observar que Gal-1 disminuía la infección de las células HL-1 con tripomastigotes de ambas cepas, se decidió analizar si *T. cruzi* modificaba el perfil de glicanos de la superficie celular y si de esta manera, podía contrarrestar o impedir el efecto Gal-1. Para este fin, se utilizó la metodología de unión de lectinas biotiniladas a los glicanos presentes en la membrana de las células y posterior análisis por citometría de flujo. Es importante remarcar que cada lectina se une a una estructura de *N*- u *O*-glicanos específica, tal como se muestra en la Figura 17 (ver Tabla 1 de Materiales y Métodos). Así, por ejemplo, Gal-1 se une a N-acetil-lactosamina, mientras que fitohemaglutinina (PHA) se une a N-glicanos complejos unidas a manosa en unión  $\beta$  (1-2) y  $\beta$  (1-6) ramificados con lactosaminas. La lectura se realizó por citometría de flujo (Figura 17).

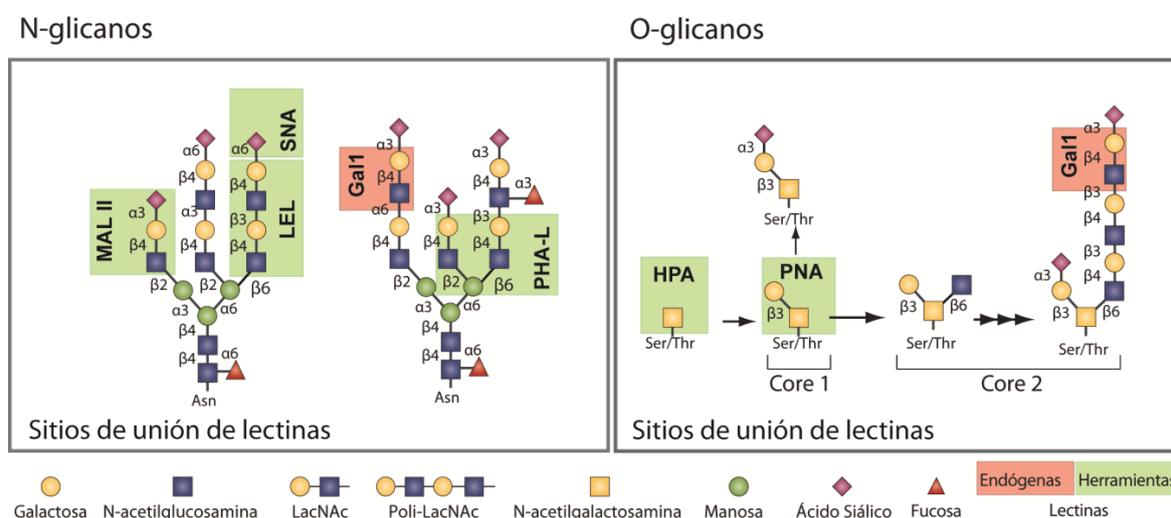


Figura 17. Representación esquemática de los sitios de unión de lectinas en N- y en O-glicanos. MAL II: Aglutinina de *Maackia amurensis*; SNA: Aglutinina de *Sambucus nigra*, LEL: Aglutinina de *Lycopersicon esculentum*; PHA-L: Fitohemaglutinina-L; HPA: Aglutinina de *Helix pomatia*; Gal-1: galectina-1. Figura adaptada de Croci y col. 2014.

El cambio en el glicofenotipo se determinó analizando dos parámetros: la cantidad de células positivas, es decir, aquellas con fluorescencia superior al umbral, y el índice de fluorescencia específico (SFI). El SFI se calculó como el cociente obtenido a partir de la fluorescencia media de la población celular con cada una de las lectinas biotiniladas sobre la fluorescencia media de las células sin ninguna lectina biotinilada, y marcadas con estreptavidina-FITC.

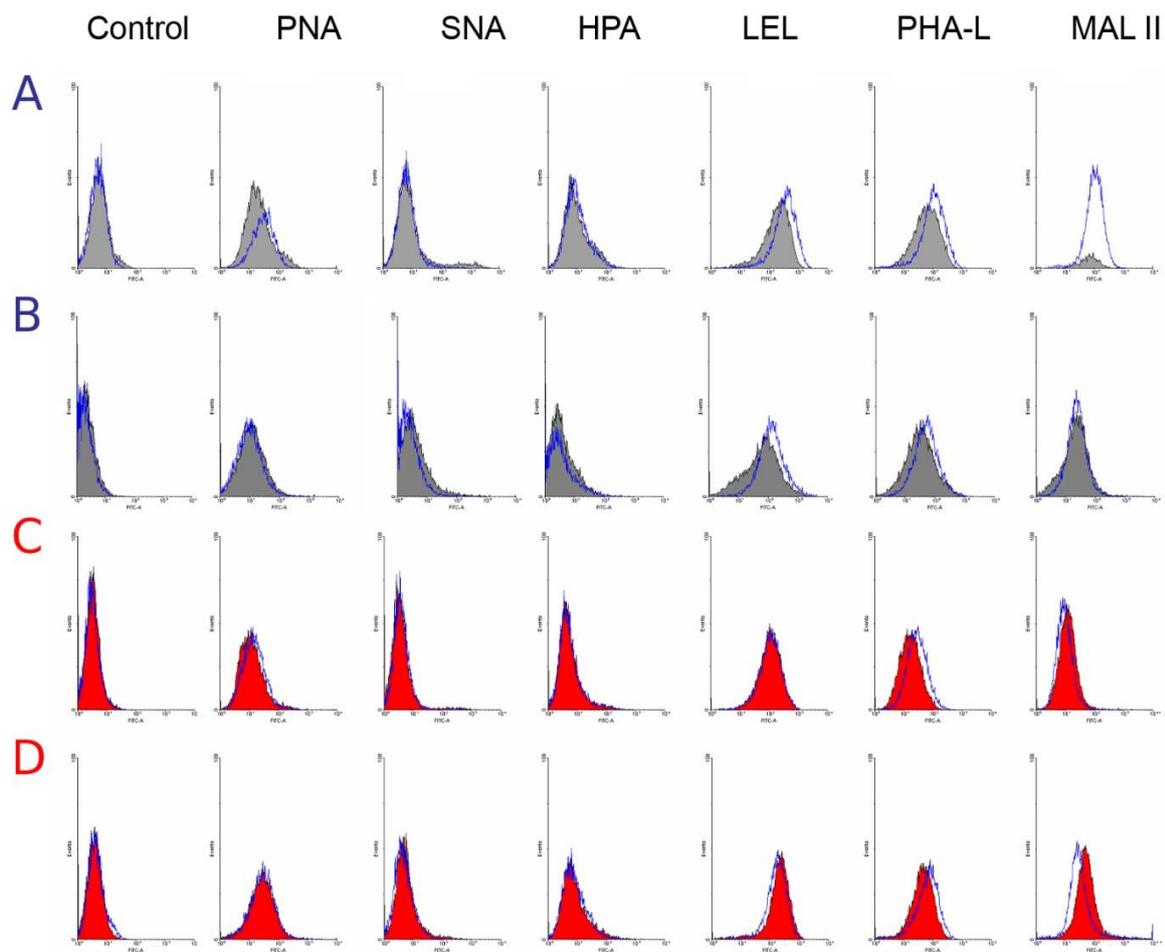


Figura 18. Histogramas de las células HL-1 infectadas con *T. cruzi* y ensayadas para las diferentes lectinas biotiniladas. Los histogramas llenos corresponden a células infectadas (gris: cepa Tulahuén, rojo: cepa Brazil); los histogramas azules vacíos corresponden a células no infectadas. El histograma de la izquierda muestra la marcación obtenida con estreptavidina-FITC (control). La Figura es representativa de tres experimentos independientes. A y C) 5 días post-infección; B y D) 2 días post infección.

Al analizar los SFI de los experimentos de glicofenotipo (Figura 18 y 19), pudo observarse una disminución de la unión de la lectina PHA-L, que se une a glicanos complejos ramificados, a los 5 días post-infección, tanto con la cepa Tulahuén como con la cepa Brazil; este fue el único cambio observado para la infección con la cepa Brazil. En los cultivos infectados con la cepa Tulahuén se detectó además una disminución de la unión de la lectina PHA-L, la disminución de la unión de la lectina LEL, es decir un acortamiento en la longitud de las cadenas de polilactosamina. Por otro lado, mientras que a los 2 días de infección con

tripomastigotes de la cepa Brazil no hubo cambios en el glicofenotipo de las células, con la cepa Tulahuén se observaron cambios en prácticamente todo el resto de las lectinas utilizadas.

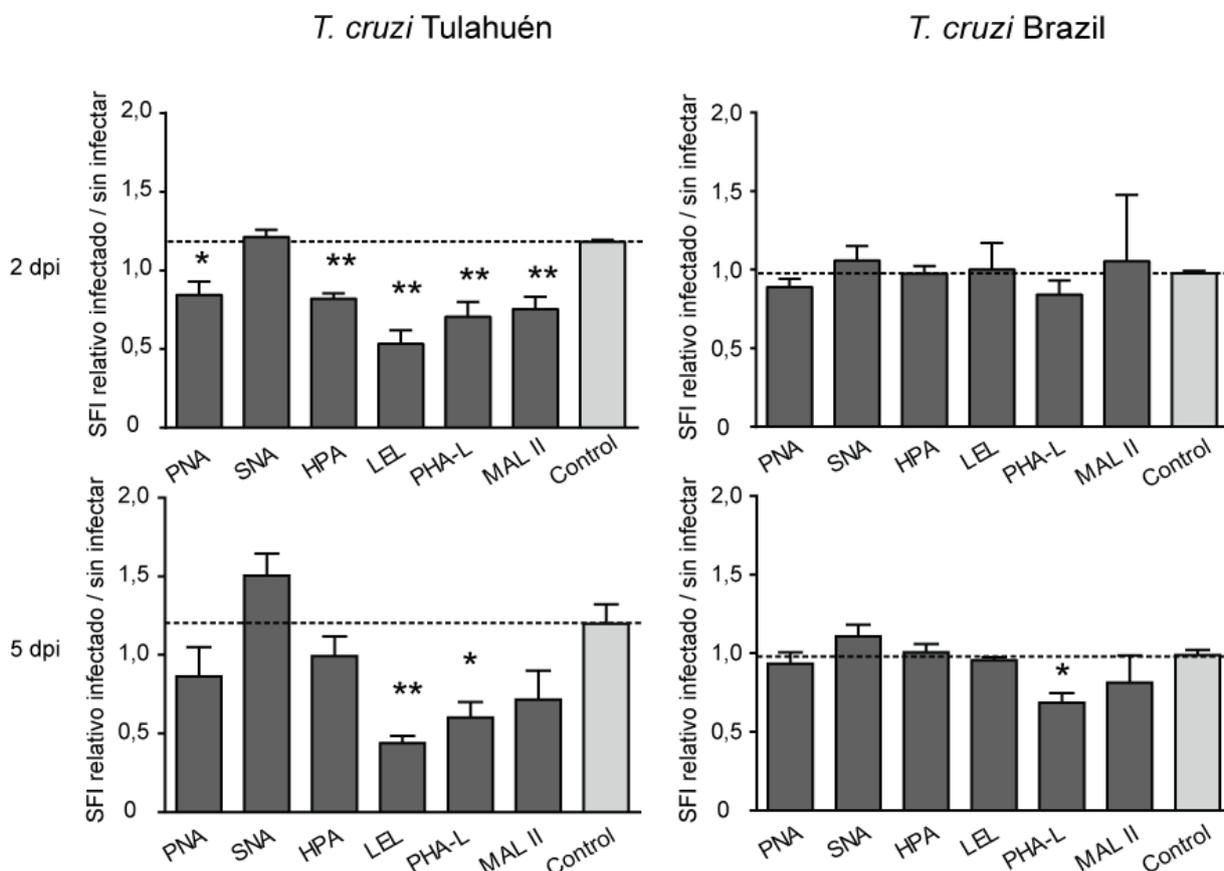


Figura 19. Glicofenotipo de las células HL-1 infectadas con *T. cruzi*. Cada barra representa el valor de SFI relativos para cada lectina, siendo estos la relación entre el SFI de la célula infectada y el de la célula sin infectar. Los gráficos corresponden a la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. La columna denominada “control” es el cociente entre los controles, infectado, y sin infectar, de las células marcadas con estreptavidina-FITC, en ausencia de lectina específica. La significancia estadística se determinó con un test de ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Cuando se analizaron los porcentajes de células con fluorescencia positiva, se observó un aumento significativo de la unión de la lectina SNA en los cultivos infectados con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, no así en la infección con la cepa Brazil (Figura 18 y 20).

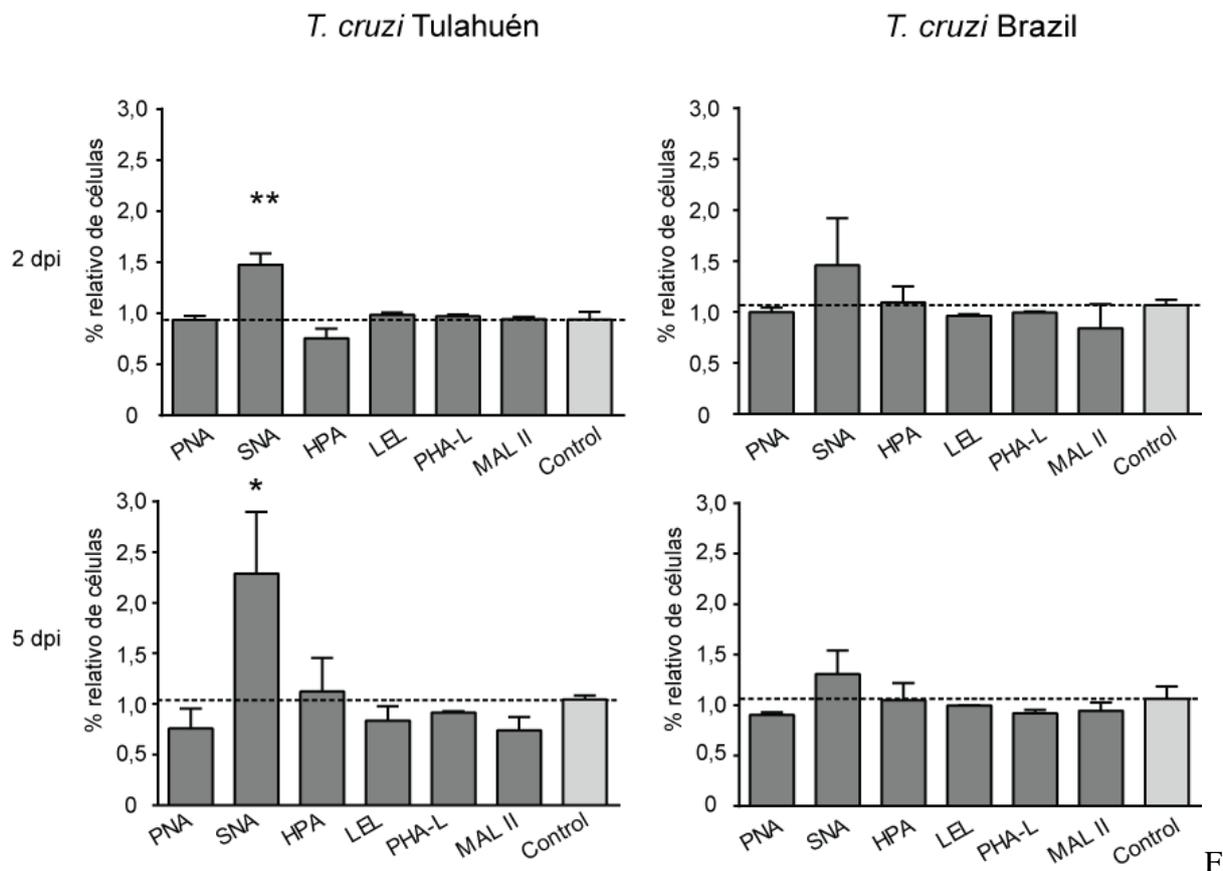


Figura 20. Glicofenotipo de las células HL-1 infectadas con *T. cruzi*. Cada barra representa el valor de porcentajes relativos de células para cada lectina, siendo estos la relación entre el porcentaje relativo de las células infectadas y el de las células sin infectar. Los gráficos corresponden a la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. La columna denominada “control” es el cociente entre los controles, infectado, y sin infectar, de las células marcadas con estreptavidina-FITC, en ausencia de lectina específica. La significancia estadística se determinó con un test de ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Con el propósito de confirmar los cambios de glicofenotipo por citometría de flujo, se decidió seleccionar el tiempo de 5 días post-infección, y analizar la unión de las lectinas LEL y PHA-L a las células, por inmunofluorescencia. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos por citometría de flujo, ya que se observó una disminución de la fluorescencia en la marcación con la lectina PHA-L en la infección con ambas cepas de tripomastigotes, y una disminución de la fluorescencia con la lectina LEL, sólo para la infección con la cepa Tulahuén (Figura 21). A pesar que se intentó realizar la marcación con la lectina SNA, no se

logró una marcación clara de las células, por lo cual los resultados obtenidos no fueron incluidos en el trabajo de Tesis.

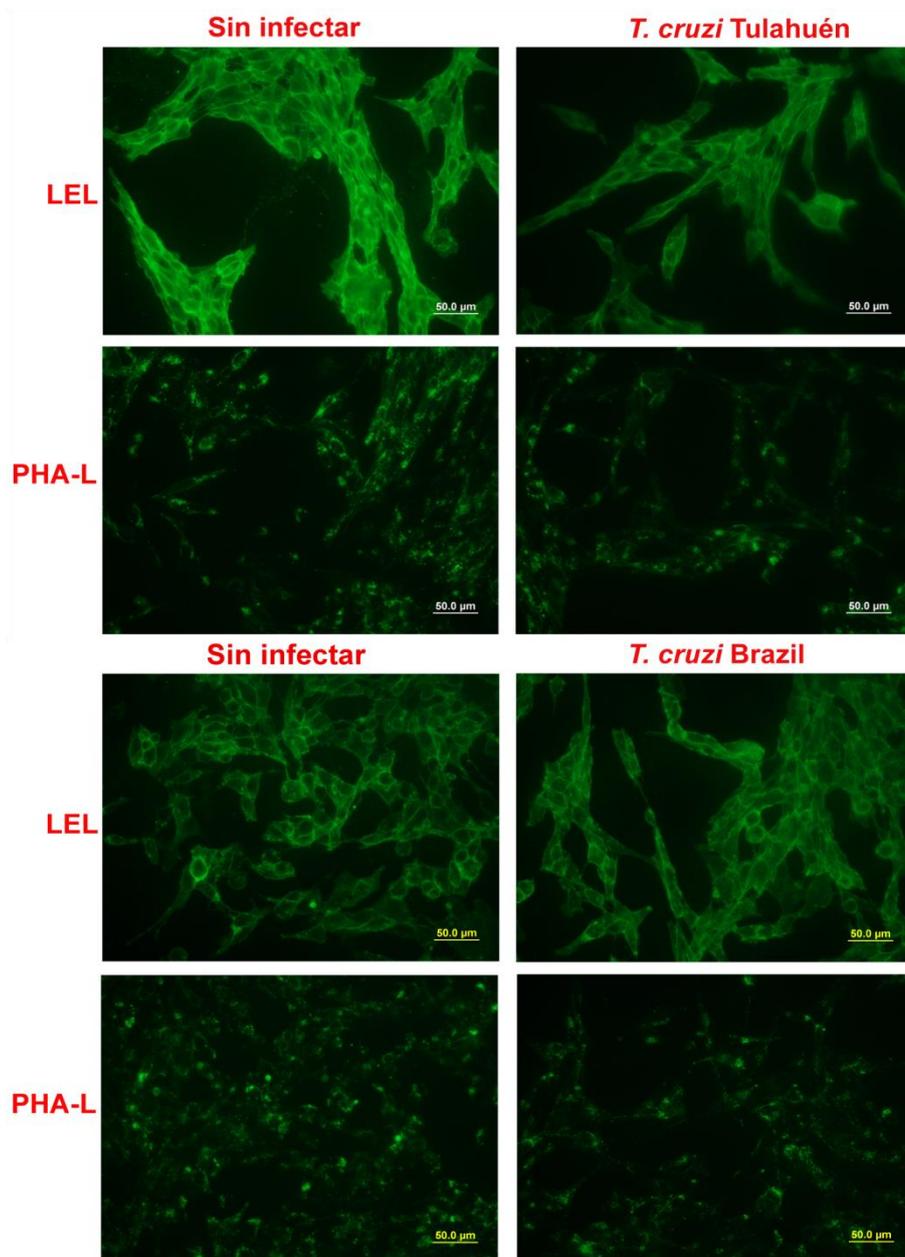


Figura 21. Microscopía de fluorescencia de las células HL-1 a los 5 días post-infección con las cepas Tulahuén y Brazil y de sus controles sin infectar, marcadas con las lectinas LEL y PHA-L.

Estos cambios en el perfil de glicanos de las células infectadas con tripomastigotes de la cepa Tulahuén, demostraron ser compatibles con un glicofenotipo menos “permissivo” a la unión de Gal-1. En otras palabras, la infección con *T. cruzi*, cepa Tulahuén, inducirían a las células a que modificaran sus glicoconjugados de superficie, para unir menos Gal-1. Con el propósito de demostrar esta hipótesis, se realizó una curva de unión de Gal-1 a las células HL-1 infectadas y sin infectar, en presencia y ausencia de lactosa.

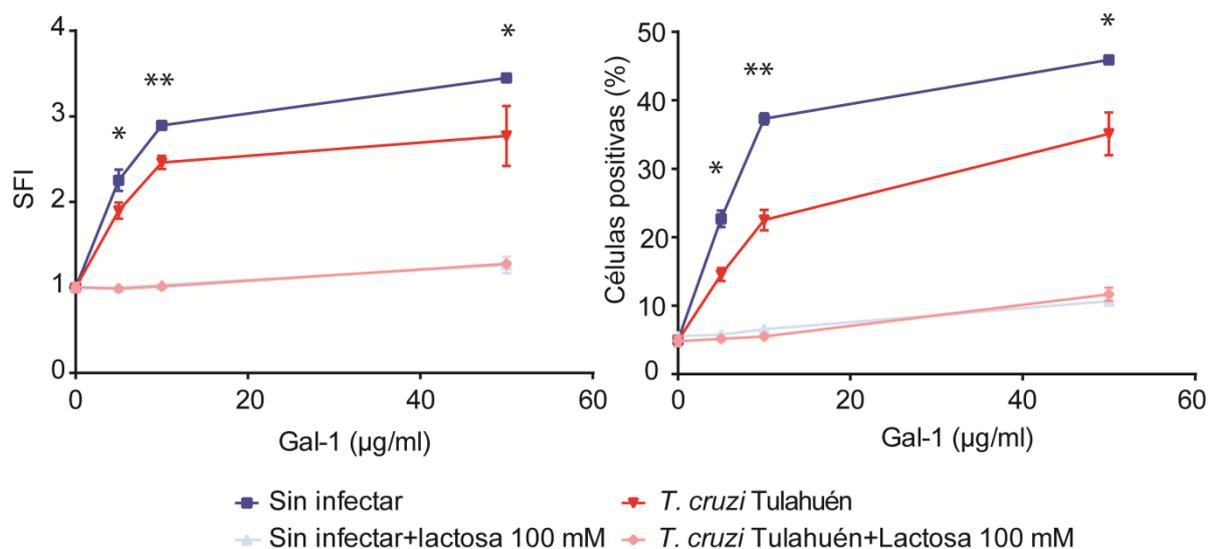


Figura 22. Curvas de unión de Gal-1 a células HL-1 infectadas y sin infectar. Estos resultados son representativos de 2 experimentos independientes. Los valores representados en los gráficos corresponden a la media  $\pm$  SEM de 2 replicados por tratamiento. La significancia estadística se analizó punto a punto utilizando el test *t* de Student. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Para todas las concentraciones evaluadas se observó una disminución significativa de la unión de Gal-1 en las células infectadas con la cepa Tulahuén; esta unión fue desplazada cuando las células fueron incubadas con lactosa 100 mM. No hubo diferencias entre las curvas de infectadas y sin infectar, al ser incubadas con lactosa (Figura 22). Estos resultados en su conjunto, sugieren que los parásitos de la cepa Tulahuén inducirían cambios en la exposición de determinados azúcares en la membrana de la célula cardíaca, disminuyendo la unión de Gal-1 y su efecto sobre la infección/invasión celular.

Con el propósito de investigar si las diferencias observadas en el cambio de glicofenotipo de las células HL-1 inducido por la infección con los tripomastigotes de la cepa Tulahuén o

Brazil podrían deberse a perfiles de glicanos específicos de linaje, se realizó una incubación de los parásitos con las lectinas biotiniladas antes mencionadas, y luego de una incubación con estreptavidina-FITC, se analizaron los resultados por citometría de flujo.

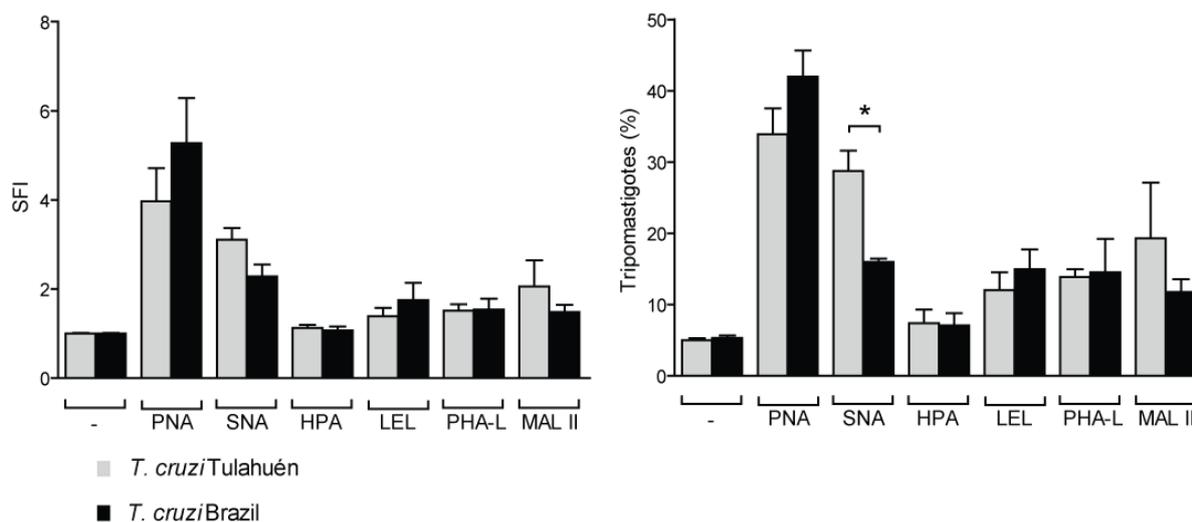


Figura 23. Glicofenotipo de tripomastigotes de ambas cepas. En la Figura se muestra la media  $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. La significancia estadística se determinó con un test de Anova de una vía, seguido del test de Bonferroni para comparar los valores obtenidos para cada cepa, y el test de Dunnet para comparar cada lectina respecto de la unión de estreptavidina-FITC sola. \* $P < 0,05$

Tal como se observa en la Figura 23, se detectó una unión significativa de la lectina PNA a los tripomastigotes de ambas cepas comparado con el control (unión de estreptavidina-FITC sola), indicando un alto porcentaje de parásitos de ambas cepas que expresan el glicano galactosil  $\beta(1-3)$ -N-acetil-galactosamina en su superficie. Con respecto a las lectinas HPA, LEL, PHA-L y MAL-II, la unión a los tripomastigotes de ambas cepas no resultó significativa (Figura 23). Un dato llamativo fue la unión de la lectina SNA, que interacciona con ácido siálico en unión  $\alpha 2-6$ , a los parásitos de ambas cepas, siendo mayor la expresión de este sacárido en los tripomastigotes de la cepa Tulahuén. Sin embargo, este resultado debería confirmarse por otras técnicas, debido a que hasta el momento, no se conoce ninguna enzima de *T. cruzi* que pueda sintetizar o transferir ácido siálico en unión  $\alpha 2-6$ . Asimismo, la unión de SNA fue la única diferencia significativa encontrada entre el glicofenotipo de Tulahuén y de Brazil

### Efecto de Gal-1 sobre la infección experimental *in vivo* en modelos murinos

Puesto que rGal-1 disminuyó la infección de las células cardíacas en experimentos *in vitro*, se decidió investigar el efecto de Gal-1 en la infección experimental por *T. cruzi*, utilizando un modelo murino. Para estos experimentos se utilizaron ratones machos y hembras de dos genotipos diferentes, C57Bl/6 de tipo salvaje (WT) y ratones con el mismo entorno genético y que presentaban anulación (*knockout*) del gen de Gal-1 (*Lgals1*<sup>-/-</sup>). Los ratones se inocularon, por vía intraperitoneal, con 2.500 tripomastigotes sanguíneos de las cepas Tulahuén y Brazil. Se utilizó el esquema de trabajo que se muestra en la Figura 24.

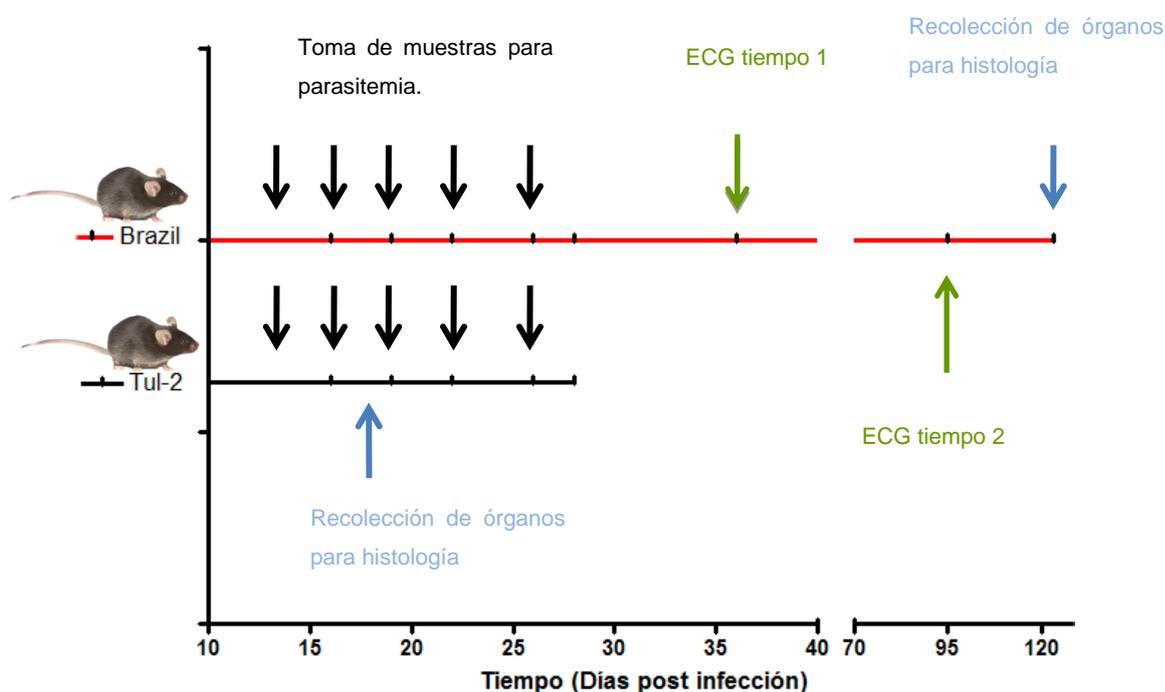


Figura 24. Protocolo de trabajo con ratones. Las flechas indican los días de recolección de sangre, de extracción del tejido muscular esquelético y cardíaco de los animales, y los días en que comenzaron a efectuarse los electrocardiogramas (sólo para los animales infectados con la cepa Brazil).

Para el caso de la infección con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, tanto en machos como en hembras se observaron mayores parasitemias en los ratones *Lgals1*<sup>-/-</sup> respecto de los ratones WT. El pico de parasitemia se produjo el día 19 para el caso de los machos, y el día 22 para el caso de las hembras. Además, los machos, tanto los WT como los transgénicos resultaron ser más susceptibles que las hembras a la infección por *T. cruzi*, ya que presentaron valores más altos de tripomastigotes en sangre en múltiples puntos temporales (Figura 25 y Tabla1).

Con respecto a la infección con la cepa Brazil, las parasitemias fueron mucho menores comparado con la infección con la cepa Tulahuén, y sólo en el caso de los machos se observó una mayor parasitemia de los animales *Lgals1*<sup>-/-</sup> respecto de los WT al día 28 post-infección (Figura 25 y Tabla 1). En este mismo día, se observó una cantidad de parásitos en sangre significativamente mayor en los machos respecto de las hembras para ambos genotipos (Figura 25).

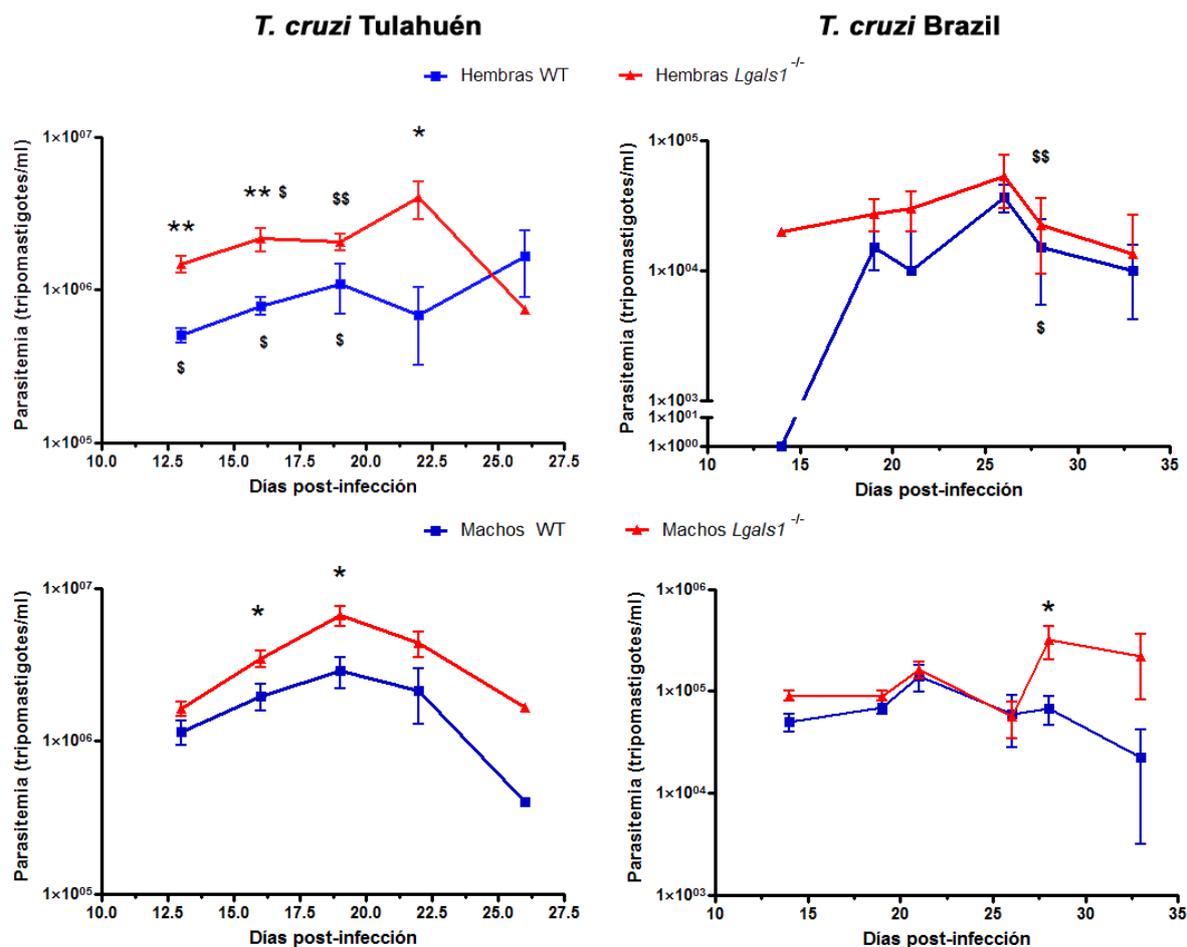


Figura 25. Parasitemia de ratones hembras y machos infectados con tripomastigotes de las cepas Tulahuén y Brazil. La parasitemia se determinó por la técnica de gota gruesa a partir de 5  $\mu$ l de sangre extraída de la cola. Las curvas se compararon punto a punto utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney. \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  *Lgals1*<sup>-/-</sup> vs WT; \$ $P < 0,05$  \$\$ $P < 0,01$  hembras vs machos.

Los niveles de máxima parasitemia fueron significativamente mayores en los ratones inoculados con tripomastigotes de la cepa Tulahuén que de la cepa Brazil. Las comparaciones

se hicieron entre grupos del mismo del mismo genotipo y del mismo género, sólo variando la cepa de parásito utilizada (Figura 26 y Tabla 1).

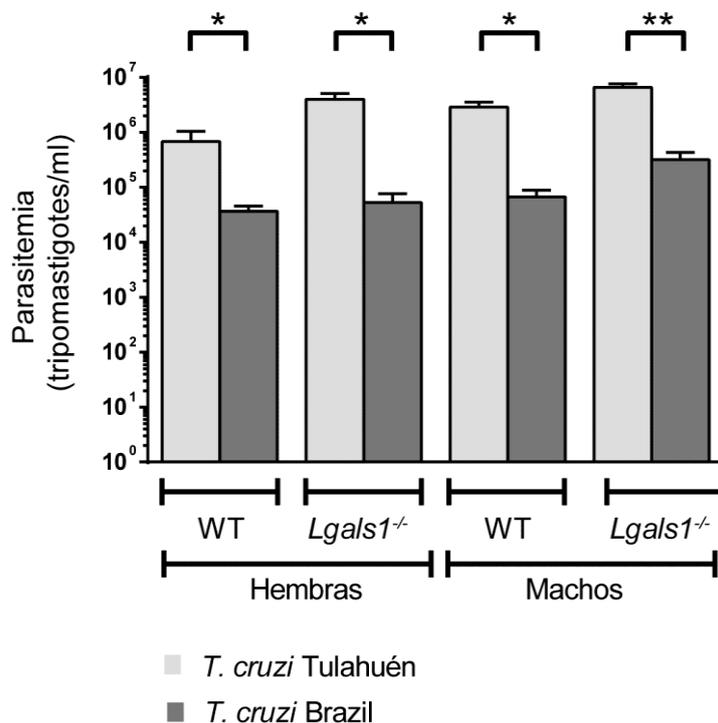


Figura 26. Niveles de parasitemia máxima en los ratones infectados con las cepas Tulahuén y Brazil de *T. cruzi*. La significancia estadística se analizó punto a punto utilizando el test no paramétrico de Mann Whithney. \*P<0,05 \*\*P<0,01.

Con el fin de evaluar la sobrevida de los animales luego de la infección, se realizó un control diario de los decesos y, luego se graficaron los hallazgos como curvas de Kaplan-Meier. Al analizar los porcentajes de supervivencia de los ratones infectados con la cepa Tulahuén (Figura 27A) se observaron resultados que demuestran una mayor susceptibilidad hacia la muerte de los ratones *Lgals1*<sup>-/-</sup> comparado con sus controles C57Bl/6 de tipo salvaje, tanto en machos como en hembras. Las curvas fueron estadísticamente significativas, y se observó un 90,9% de mortalidad en el grupo transgénico, respecto de un 37,5% en el grupo WT, y una diferencia significativa en el tiempo de sobrevida (Figura 27 y Tabla 1). Además, se observó que los ratones *Lgals1*<sup>-/-</sup> machos comenzaban a morir más tempranamente que su grupo control, aunque las curvas no diferían entre sí, observándose sólo una tendencia no significativa.

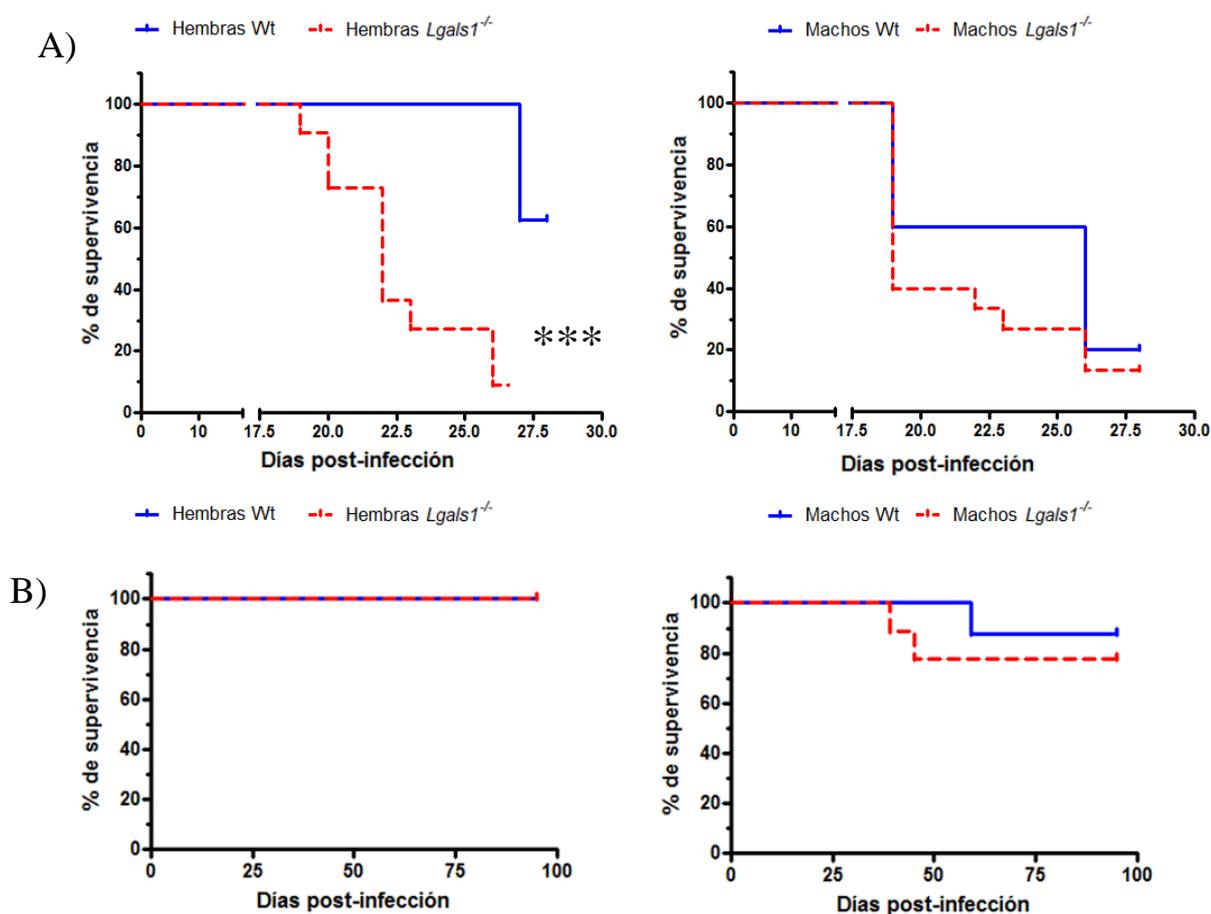


Figura 27. Curvas de Kaplan-Meier de ratones infectados con Tulahuén(A), hembras (n=17) y machos(n=20), y con la cepa Brazil (B), hembras (n=17) y machos(n=17). Se utilizaron 35 animales sin infectar como grupo control de la infección con ambas cepas (10 para la infección con la cepa Tulahuén, y 25 para la infección con la cepa Brazil). Ninguno de los animales sin infectar murió durante los ensayos (no graficado). El análisis estadístico de las curvas se analizó utilizando el test de Log-rank. \*\*\* P<0,001.

Tabla 1. Infección de ratones C57Bl/6 de tipo salvaje y deficientes en el gen de Gal-1 por *T. cruzi*.

Cepa de <i>T. cruzi</i>	Ratones	Parasitemia- Mediana y rango(tripomastigotes/ml x10 <sup>-4</sup> )	Tiempo de supervivencia (días)	Mortalidad (%)
Tulahuén	Hembras <i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	540 (98-610)	22,20±2,35	90,9
	Hembras WT	30 (20-280)	27	37,5
	Machos <i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	690 (340-1052)	20,61±2,96	86,7
	Machos WT	290 (140-420)	22,5±4,04	80
Brazil	Hembras <i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	3 (3-10)	ND	0
	Hembras WT	4 (2-5)	ND	0
	Machos <i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	16 (12-66)	42±4,24	22,2
	Machos WT	5 (4-13)	59	12,5

Por el contrario, los ratones *Lgals1*<sup>-/-</sup> y WT infectados con la cepa Brazil sobrevivieron en su totalidad durante los primeros 30 días post-infección. Sólo en el caso de los ratones *Lgals1*<sup>-/-</sup> machos, se comenzaron a observar algunos eventos de muerte luego de los 40 días post-infección (Figura 27B).

El conjunto de los datos mostró la existencia de una diferencia de susceptibilidad de infección en los ratones C57Bl/6 macho y hembra, según la cepa de *T. cruzi* utilizada. Por otro lado, los ratones deficientes en el gen de Gal-1 infectados con la cepa Tulahuén presentaron mayores parasitemias e índice de muerte que los animales WT, evidenciando diferencias según el género del animal.

Dado el alto porcentaje de supervivencia en los animales infectados con la cepa Brazil, se decidió realizar electrocardiogramas a los 35 y 95 días post-infección, en busca de alteraciones cardíacas diferenciales entre ambos grupos

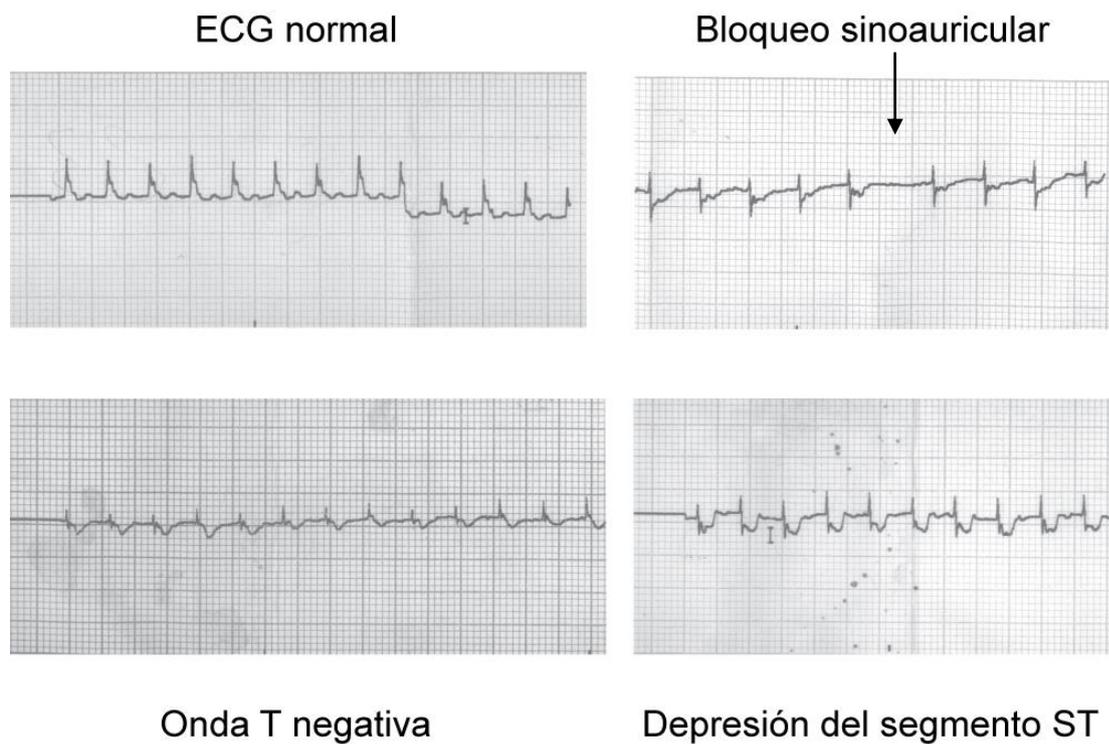
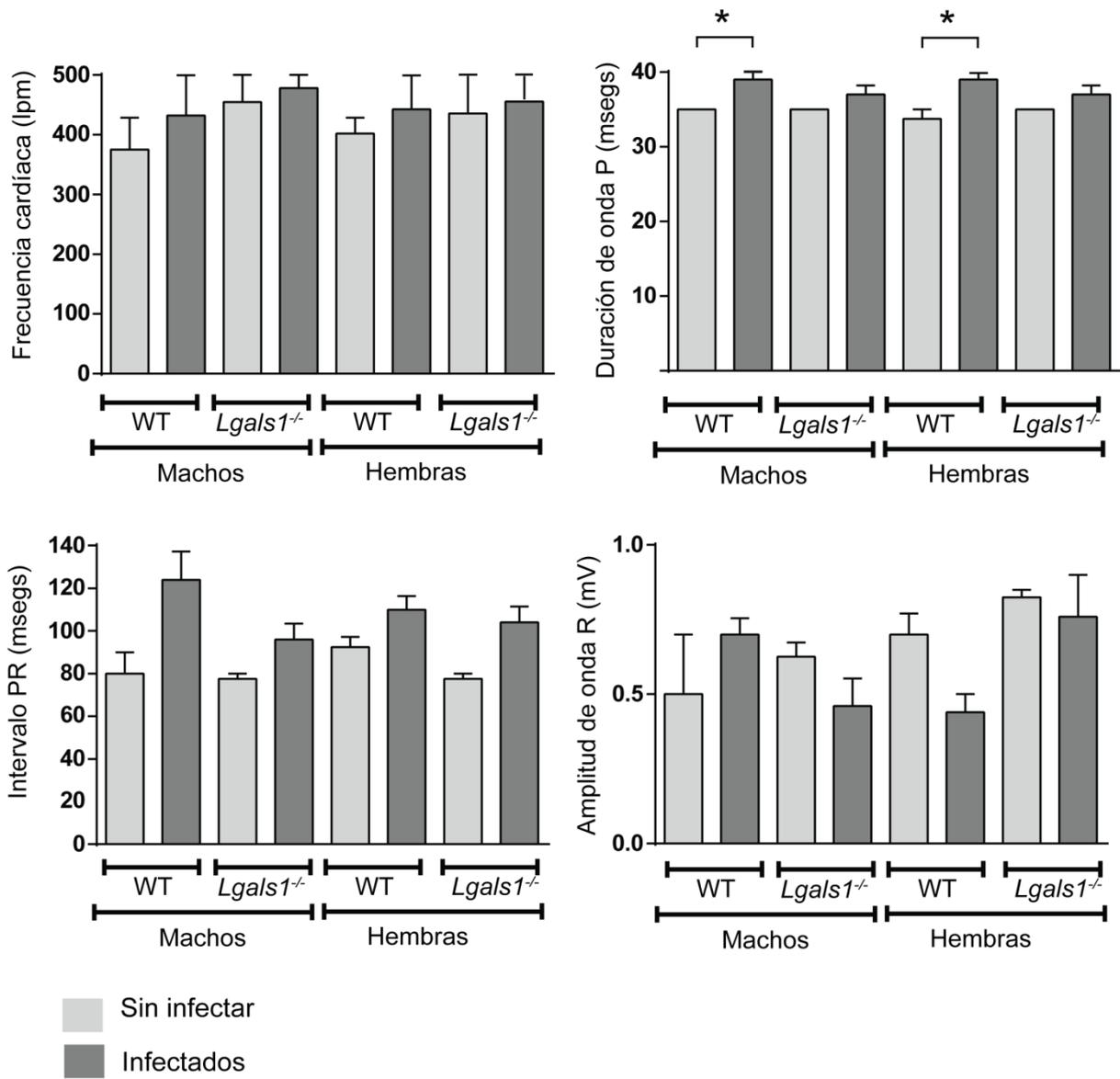


Figura 28. Registros electrocardiográficos representativos de las alteraciones observadas en los ratones infectados con tripomastigotes de la cepa Brazil.

A modo de ejemplo, en la Figura 28 se muestran los registros electrocardiográficos de animales sin alteraciones cardíacas y con anomalías, tales como bloqueo sinoauricular, onda T negativa y depresión del segmento ST.

Tanto a los 35 como a los 95 días post-infección, la mayoría de los ratones infectados, independientemente del género o genotipo, presentaron alguna de las alteraciones electrocardiográficas mencionadas en el párrafo anterior (Figura 28). Este hecho demuestra que a pesar de que no hubo mortalidad de ratones inoculados con la cepa Brazil durante los primeros 35 días post-infección, los animales desarrollaron algún tipo de patología cardíaca debida a la infección.

Las proporciones de cada alteración se representan en las Tablas 4 y 5. En cuanto a la cuantificación de los distintos parámetros como frecuencia cardíaca, duración de onda P, Amplitud de onda R, duración del complejo QRS, y duración del intervalo PR, sólo se observó un aumento de la duración de onda P en los animales de tipo salvaje, infectados respecto de los no infectados al día 35 post-infección, tanto para machos como para hembras, y que no se observó en los animales *Lgals1<sup>-/-</sup>*. En la infección en humanos, el aumento de este parámetro se puede correlacionar, o bien con una falla auricular, o bien, indirectamente con falla de los ventrículos, lo que haría aumentar la presión de fin de llenado ventricular y esto se transmitiría como un aumento de la presión intra-auricular (Te-Chuan Chou y col. 1996). Sin embargo, las alteraciones en la re-polarización no fueron concluyentes debido a que en el contexto del resto de los parámetros, y ante la ausencia de grandes diferencias en la patología cardíaca constituirían una alteración menor. Al día 95 post-infección, las duraciones de las ondas P parecen igualarse, lo cual, sumado a la disminución de alteraciones cualitativas en el caso de las hembras, puede estar sugiriendo una recuperación de los animales ante la infección (Figura 29).



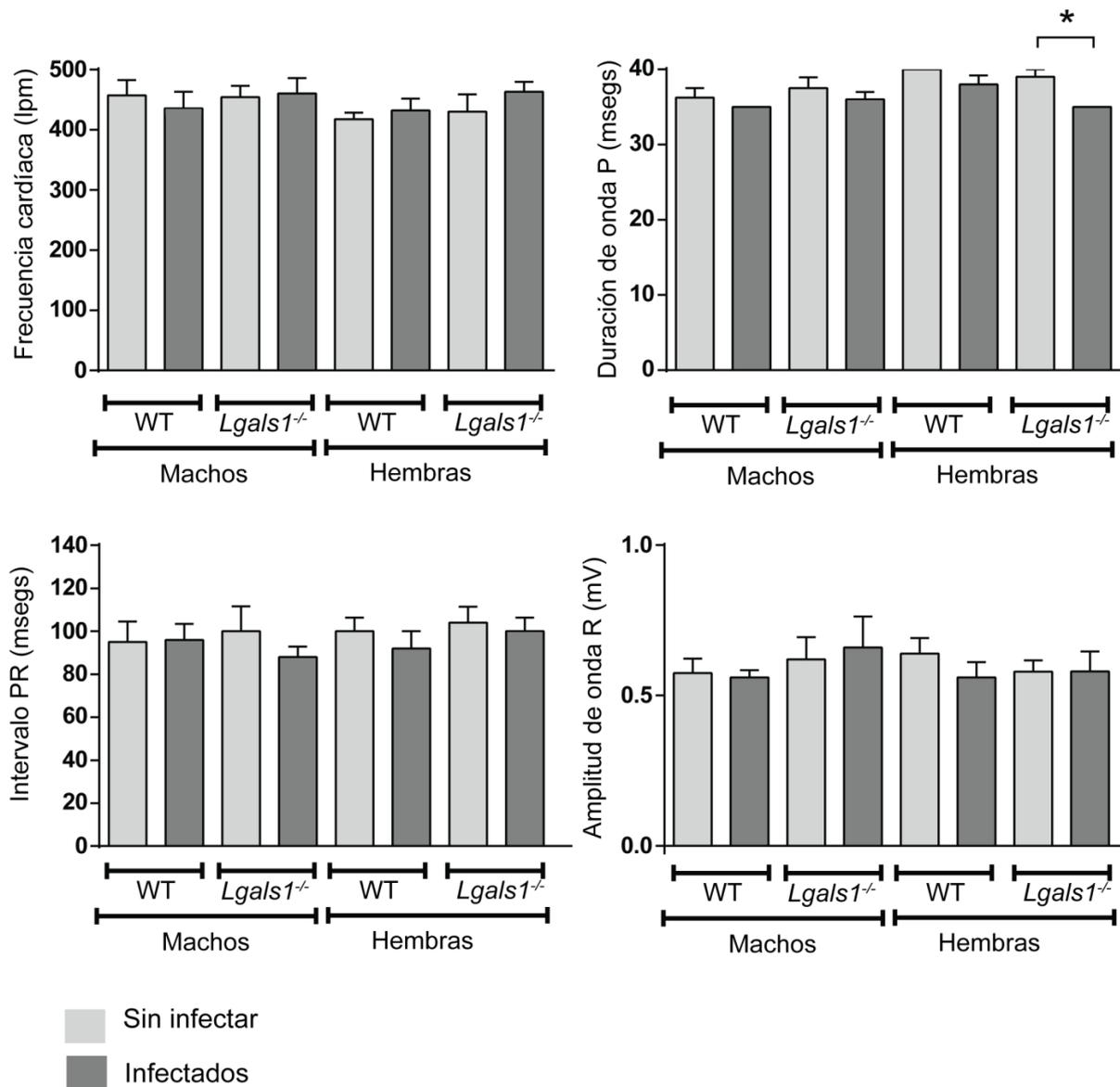


Figura 29. Parámetros electrocardiográficos de los ratones infectados con la cepa Brazil analizados a los 35 y a los 95 días post-infección. Los parámetros analizados fueron la frecuencia cardíaca, la duración de la onda P, el intervalo PR y la amplitud de la onda R. El análisis estadístico se realizó utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido del test *a posteriori* de Dunns.

Tabla 2. Parámetros electrocardiográficos de los ratones C57Bl/6 de tipo salvaje y deficientes en el gen de Gal-1 a los 35 días post-infección con *T. cruzi* de la cepa Brazil

Grupo	Infección	% de animales con alteraciones cardíacas			
		Depresión del segmento ST	Inversión de onda T	Depresión ST+ onda T negativa	Sin alteración
Machos WT	Sin infectar	0	0	0	100
Machos <i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	Sin infectar	0	0	0	100
Hembras WT	Sin infectar	0	0	0	100
Hembras <i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	Sin infectar	0	0	0	100
Machos WT	Brazil	100	0	0	0
Machos <i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	Brazil	40	0	20	40
Hembras WT	Brazil	20	40	0	40
Hembras <i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	Brazil	40	40	0	20

Tabla 3. Parámetros electrocardiográficos de los ratones C57Bl/6 de tipo salvaje y deficientes en el gen de Gal-1 a los 95 días post-infección con *T. cruzi* de la cepa Brazil

Grupo	Infección	% de animales con alteraciones cardíacas			
		Depresión del segmento ST	Inversión de onda T	Bloqueo sinoauricular de 3 grado+depresión ST	Sin alteración
Machos WT	Sin infectar	20	0	0	80
Machos <i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	Sin infectar	20	0	0	80
Hembras WT	Sin infectar	0	0	0	100
Hembras <i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	Sin infectar	20	0	0	80
Machos WT	Brazil	40	20	20	20
Machos <i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	Brazil	80	0	0	20
Hembras WT	Brazil	40	0	0	60
Hembras <i>Lgals1</i> <sup>-/-</sup>	Brazil	40	0	0	60

Con el propósito de analizar si la ausencia de Gal-1 modificaba el número de nidos de amastigotes y el grado de inflamación en el tejido muscular cardíaco y esquelético, se

extrajeron dichos órganos a los 19 dpi en los animales infectados con la tripomastigotes de la cepa Tulahuén y a los 120 dpi en los ratones infectados con la cepa Brazil. Luego, se realizó la tinción de los órganos con hematoxilina-eosina, y se analizaron en los preparados el índice de inflamación, índice de necrosis, y densidad parasitaria (número de nidos de parásitos/mm<sup>3</sup> de tejido), realizado por estudio a ciego.

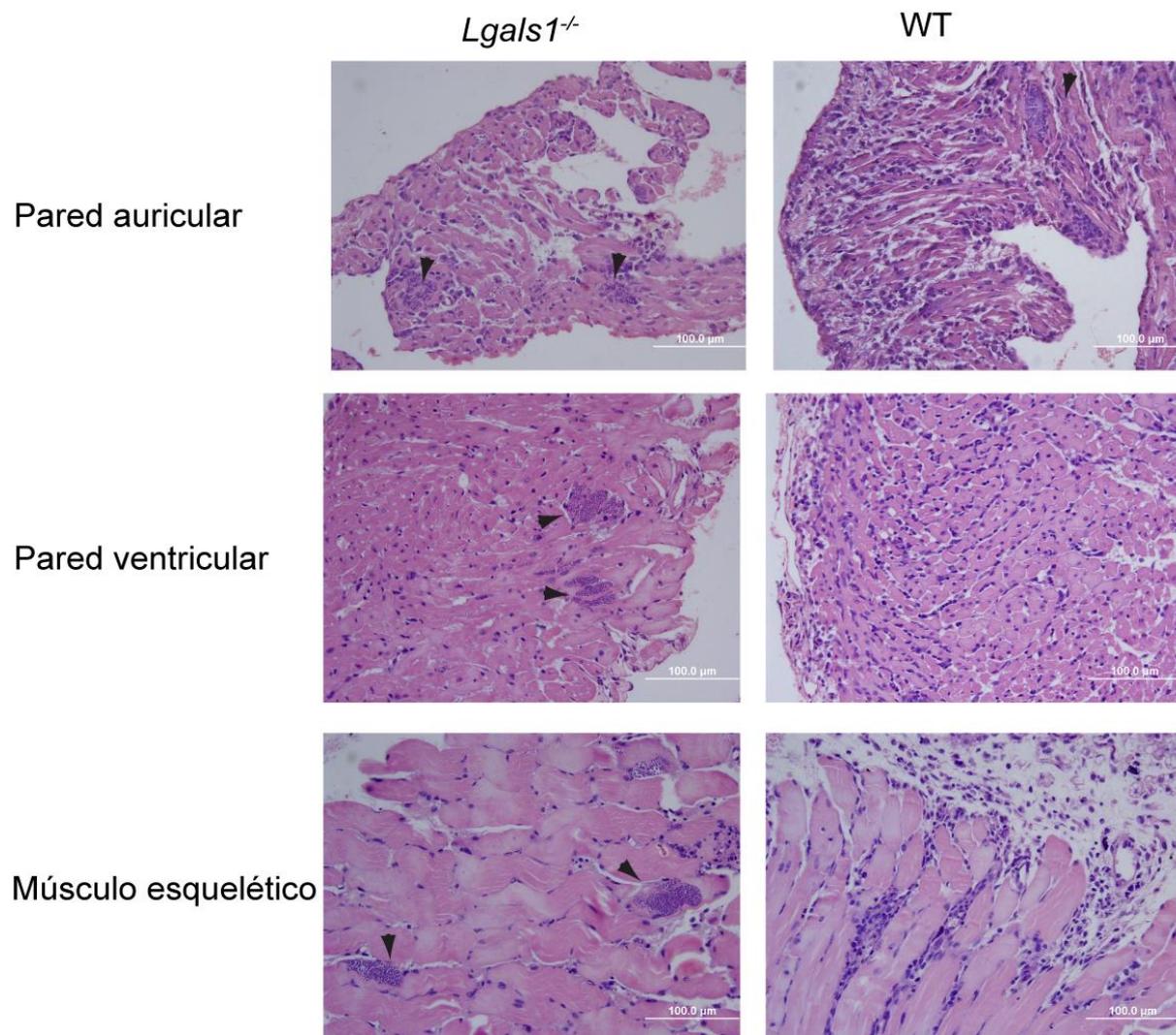


Figura 30. Presencia de nidos de amastigotes e inflamación en órganos de ratones infectados con tripomastigotes de la cepa Tulahuén. Las imágenes corresponden a tinciones con hematoxilina-eosina de corazón y músculo esquelético, de ratones infectados con la cepa Tulahuén. Las muestras fueron tomadas al día 19 post infección. Se muestra una imagen representativa de ratones deficientes para Gal-1, y de ratones C57Bl/6. Las flechas indican los nidos de amastigotes.

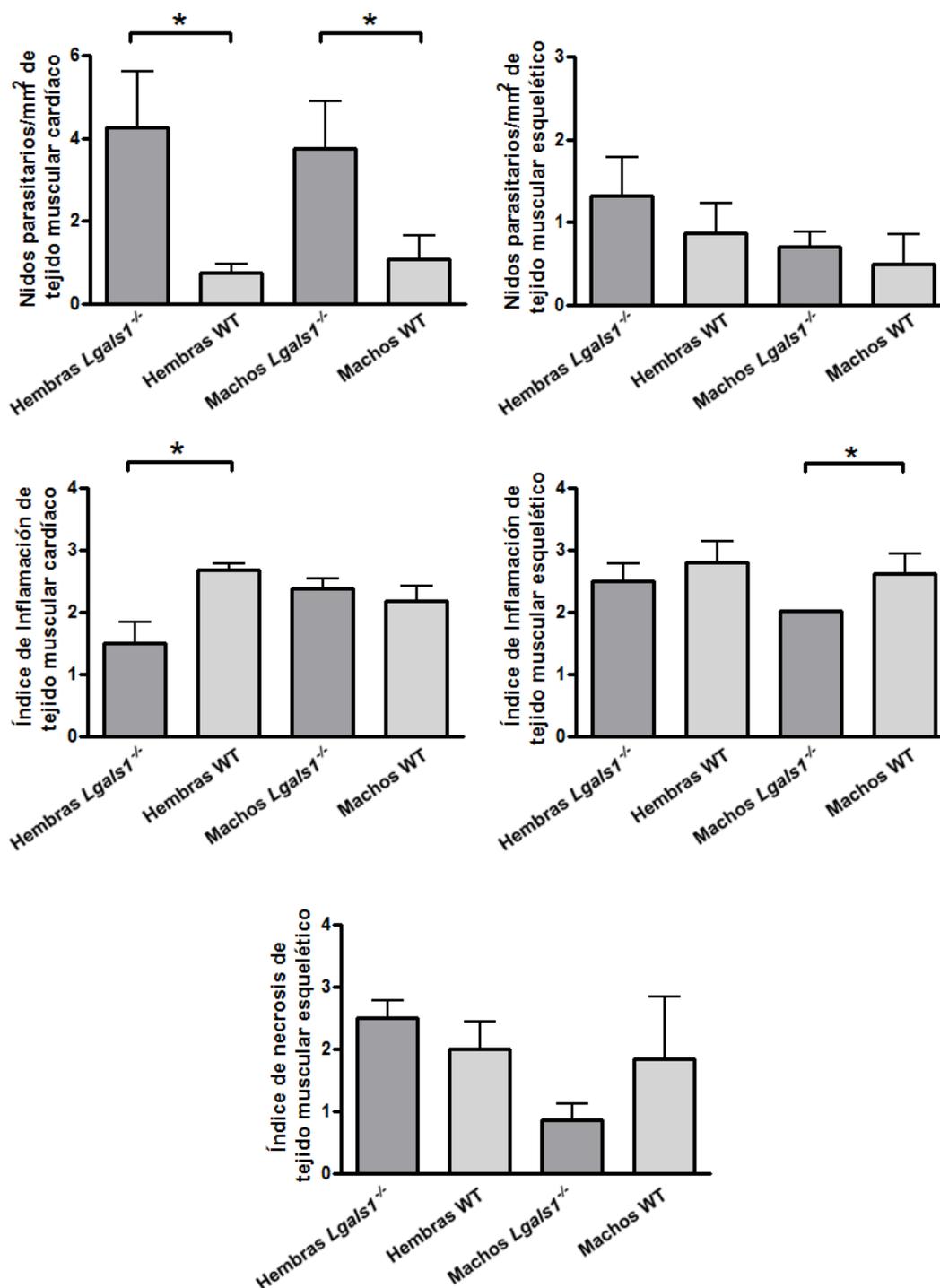


Figura 31. Densidad parasitaria e índice de inflamación y necrosis en corazón y músculo esquelético, durante la infección experimental de ratones con la cepa Tulahuén. Los nidos fueron contados en un microscopio óptico y relativizados al área del corte visualizada. Las áreas de cada sección se determinaron utilizando el programa Image J. Las barras corresponden a la media  $\pm$  SEM de 4-7 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó utilizando test no paramétrico de Mann-Whitney. \* $P < 0,05$ .

Los resultados mostraron que los ratones C57Bl/6 *Lgals1*<sup>-/-</sup> infectados con tripomastigotes de la cepa Tulahuén presentaron mayores parasitismos en el corazón, que sus controles de fenotipo de tipo salvaje, tanto en hembras como en machos (Figura 30 y 31). Además, los ratones *Lgals1*<sup>-/-</sup> hembras presentaron un menor índice de inflamación en el tejido cardíaco, mientras que los animales *Lgals1*<sup>-/-</sup> machos lo presentaron en el tejido muscular esquelético (Figura 30 y 31). No se observó necrosis en el tejido cardíaco de ninguno de los animales *Lgals1*<sup>-/-</sup> y WT macho y hembras, y aunque sí se detectó necrosis en tejido muscular esquelético, no se hallaron diferencias entre los diferentes grupos estudiados (Figura 31).

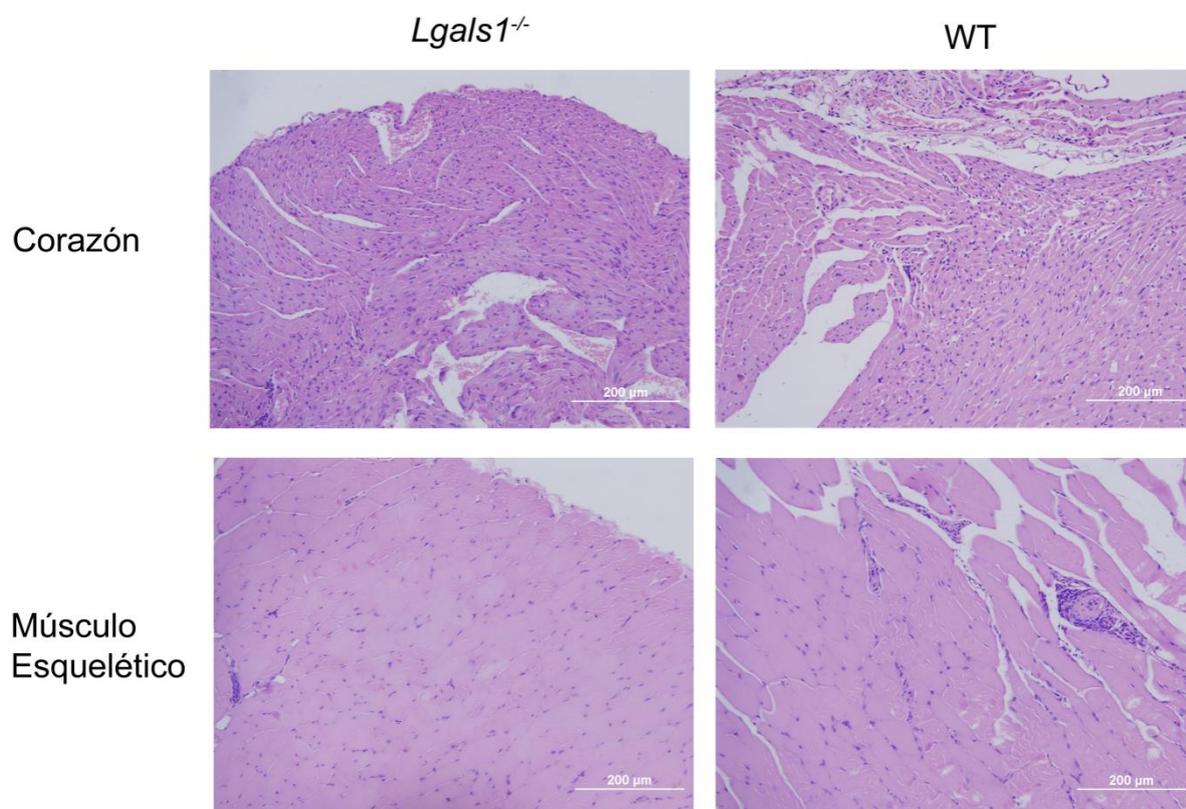


Figura 32. Inflamación de órganos de ratones infectados con tripomastigotes de la cepa Brazil. Tinción con hematoxilina-eosina de muestras de corazón y músculo esquelético de ratones infectados con la cepa Brazil. Las muestras fueron tomadas al día 120 post-infección. Se muestra una foto representativa de ratones deficientes para Gal-1, y de ratones C57Bl/6.

El análisis histológico de las muestras de tejido cardíaco y músculo esquelético de animales infectados con la cepa Brazil reveló la ausencia de nidos de amastigotes intracelulares en

todos los ratones estudiados, independientemente de su genotipo y género. Asimismo, el número de infiltrados inflamatorios fue escaso, no hallándose diferencias entre los grupos de animales.

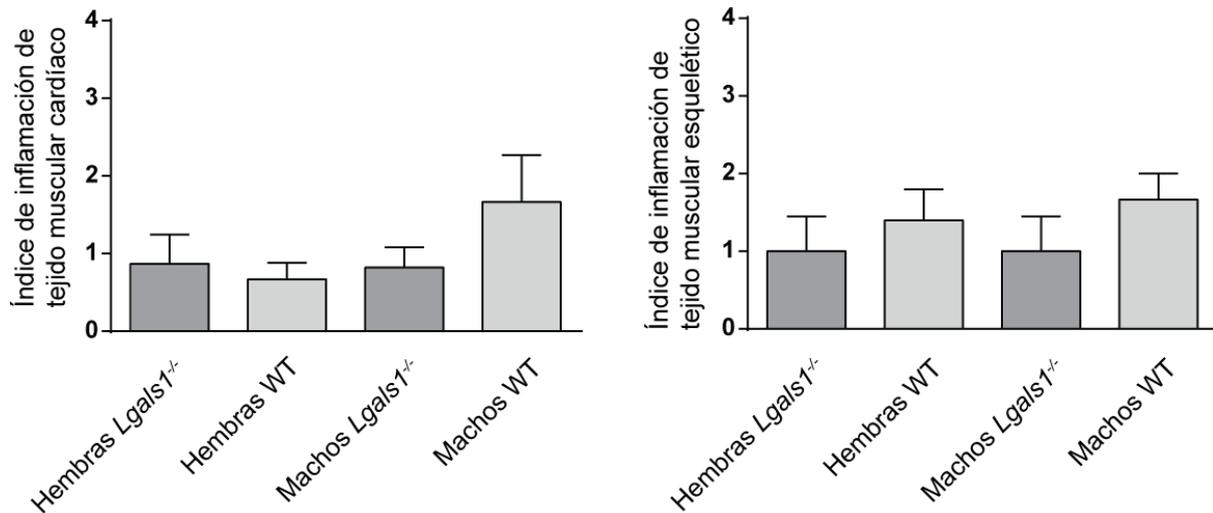


Figura 33. Índice de inflamación de corazón (izquierda) y músculo esquelético (derecha) de ratones infectados con la cepa Brazil. Las barras corresponden a la media  $\pm$  SEM de 3-5 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó utilizando test no paramétrico de Mann-Whitney.

En su conjunto, los resultados no arrojan diferencias significativas entre animales *Lgals1*<sup>-/-</sup> y C57Bl/6 WT a 120 días post-infección con tripomastigotes de la cepa Brazil.

## **Discusión**

En numerosas infecciones parasitarias, existe un equilibrio entre el parásito y el hospedador, en el cual ninguno de los dos logra prevalecer, estableciéndose una infección crónica. En esta etapa, el sistema inmune tiene un rol esencial, y el hospedador debe generar una respuesta lo suficientemente efectiva para evitar una proliferación letal del parásito, pero sin ser tan exacerbada que le provoque un daño a sí mismo (Rabinovich y col. 2005). Gal-1 es una importante molécula regulatoria del sistema inmune, que se encuentra aumentada en biopsias cardíacas de pacientes con Enfermedad de Chagas-Mazza (Giordanengo y col. 2001). En este trabajo de Tesis Doctoral se demostró que la concentración de esta lectina se encuentra aumentada en sueros de pacientes infectados en la etapa crónica de la enfermedad respecto de individuos sanos, y que ejerce un efecto protector en la infección experimental por *T. cruzi*.

Gal-1 logró disminuir significativamente el número de parásitos de las cepas Tulahuén y Brazil en las células cardíacas murinas HL-1, tanto en infecciones cortas en las que los tripomastigotes invadían las células y efectuaban unas pocas rondas de replicación, como en infecciones de 4 días, en los que los parásitos contaban con el tiempo suficiente como para efectuar ciclos de re-infección. Este efecto protector se observó, tanto con el agregado de Gal-1 recombinante exógena a los cultivos, como con la sobre-expresión de Gal-1 endógena por parte de la célula. En estos ensayos, se efectuaron los controles correspondientes con lactosa 100 mM, que permitieron corroborar que la fracción secretada de esta lectina era la que ejercía el efecto funcional, a través de su unión a glicanos de la superficie celular.

El otro efecto ejercido por Gal-1 sobre los cardiocitos fue la disminución del número de células en apoptosis temprana inducida por *T. cruzi*. Es decir, que Gal-1 no sólo impediría la infección parasitaria de las células cardíacas, sino que además, de mantenerse este efecto *in vivo*, protegería a los tejidos del hospedador de una pérdida de funcionalidad de sus órganos. El mecanismo a través del cual Gal-1 ejerce estos efectos protectores es independiente de la unión de esta lectina al parásito, como lo demuestra la ausencia de unión de Gal-1 recombinante, a la superficie de tripomastigotes de las cepas Tulahuén y Brazil bajo nuestras condiciones experimentales.

Estos hallazgos podrían deberse a la capacidad de Gal-1 de formar mallas o *lattices* en la superficie celular por unión a diversos receptores. Esta red ordenada permitiría el agrupamiento de algunas proteínas de superficie específicas en la célula cardíaca que presenten una estructura de glicanos adecuada capaz de favorecer la unión de Gal-1. Como se

mencionó anteriormente, no observamos unión de Gal-1 a tripomastigotes; sin embargo esta lectina podría facilitar la formación de complejos de superficie que impidan la invasión de *T. cruzi* a las células. Por otro lado, Gal-1 podría generar algún tipo de conformación desfavorable a la unión de Gal-3, que esta descrita como una molécula facilitadora de la entrada del parásito a la célula (De Souza y col. 2010). A diferencia de lo que ocurre con Gal-1, existen varios trabajos en los que se demuestra la unión de Gal-3 a glicanos de superficie de *T. cruzi*. De esta forma, Gal-3, actuaría como puente entre proteínas de la superficie del parásito y proteínas de la matriz extracelular (ej. laminina) de las células del hospedador, facilitando la unión y posterior invasión de *T. cruzi* a algunos tipos celulares como células musculares lisas de la arteria coronaria (Moody y col. 2000; Kleshchenko y col. 2004; De Souza y col. 2010). Además, en el caso de esta glectina de tipo quimera, su aumento se halla asociado a daño cardíaco, y es un marcador de fibrosis en humanos (Lok y col. 2009; De Boer y col. 2010; De Boer y col. 2011).

Por este motivo, se evaluó si existía algún tipo de regulación en la expresión de Gal-1 y de Gal-3 por parte de la célula cardíaca. Los resultados mostraron que, sólo en el caso de la infección de las células HL-1 con la cepa Brazil se observó un aumento de Gal-3, mientras que no hubo variación en la expresión de Gal-3 cuando las células se infectaron con tripomastigotes de la cepa Tulahuén. Sin embargo, al ser también un marcador de daño cardíaco queda por dilucidar si este incremento de la expresión no es secundario al daño celular producido por el parásito. En relación a Gal-1, no se observó un aumento de la producción de dicha glectina por parte de los cardiomiocitos de cultivo, infectados con tripomastigotes de ninguna de las dos UDT (I y VI), utilizadas en los ensayos de este trabajo de Tesis, lo cual llevaría a pensar que no habría una regulación positiva de esta lectina durante la infección con *T. cruzi*. Sin embargo, pudo observarse un aumento de la concentración de Gal-1 en sobrenadantes de cultivo de las células cardíacas a los 5 días post-infección. Este aumento podría deberse a una mayor secreción de la proteína exportada por mecanismos no clásicos, o bien a una liberación secundaria a la ruptura de las células por la infección con *T. cruzi* (van Kooyk y Rabinovich, 2008; Sato y col. 2009; Vasta 2012). Sin embargo, dado que también se observó un aumento de la actividad de la enzima intracelular lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante de cultivo, los resultados sugieren que el origen de esta lectina en el espacio extracelular se debería principalmente a la lisis de la célula cardíaca. En este sentido, existen trabajos que postulan a Gal-1 como un patrón molecular asociado a daño (DAMP) o como una proteína que reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y efector de la inmunidad innata, como en el caso de diversas

infecciones por virus. Tal es el caso de las infecciones por el virus Nipah y Hendra, donde esta lectina inhibe la infección por reconocimiento y unión a glicanos específicos de la superficie de los viriones (Vasta, 2009). En el caso de la enfermedad de Chagas-Mazza, Gal-1 no parece comportarse como una proteína que reconozca PAMP, dada la ausencia de unión de la lectina a tripomastigotes de *T. cruzi*. Sin embargo, la liberación de Gal-1, secundaria a la ruptura celular, y la disminución del número de células infectadas por *T. cruzi* debidas al efecto de esta lectina, aportan elementos para encuadrarla dentro de un DAMP (Sato y col. 2009).

Por otro lado, la exposición a *T. cruzi* logró modificar el patrón de glicanos de superficie de la célula HL-1, aunque estas exhibieron una respuesta diferencial en cuanto a los cambios generados. Mientras que la infección de las células con tripomastigotes de la cepa Tulahuén, indujo la aparición de un glicofenotipo menos permisivo a la unión de Gal-1, el cambio en el patrón de glicoconjugados fue mucho más leve al infectar las células cardíacas con la cepa Brazil. En el primer caso y para los 5 días post-infección, se observó una disminución de la longitud de las cadenas de lactosamina, como pudo observarse por la disminución de la unión de la lectina LEL. Por otro lado, se observó un aumento de ácido siálico en posición  $\alpha 2-6$  de las cadenas terminales de N-glicanos, revelado a través del aumento de la unión de SNA y una disminución de N-glicanos de tipo complejo, que se desprende de la menor unión de la lectina PHA-L. Puesto que estos cambios se correlacionan con una posible disminución de la unión de Gal-1 a la membrana celular, se realizó una curva de unión en distintas concentraciones que permitió comprobar un glicofenotipo menos permisivo a la interacción de Gal-1 en células infectadas con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*.

En cuanto al glicofenotipo obtenido a los 2 días post-infección, no hubo diferencias en la infección de las células con tripomastigotes de la cepa Brazil respecto de sus controles sin infectar. Al infectar con parásitos de la cepa Tulahuén, se detectaron las mismas diferencias en el patrón de glicanos que se observaron a los 5 días post-infección, sumado a la disminución de la unión de estructuras de tipo *core 1* (no sialiladas) en cadenas de O-glicanos, revelado como una disminución en la unión de PNA, una disminución de la unión de N-acetilgalactosaminas terminales libres, manifestado por la menor unión de HPA, y una disminución en ácido siálico en posición  $\alpha 2-3$ , observado como una disminución en la unión de MAL II. Es interesante destacar que *T. cruzi* presenta una familia de enzimas llamada trans-sialidasas, que catalizan la transferencia de ácido siálico en unión  $\alpha 2-3$  de glicoconjugados de la superficie celular hacia residuos de galactosa libre de mucinas de *T.*

*cruzi*, y esas enzimas probablemente estén implicadas en la disminución de la unión de MAL II a la célula HL-1 (Schenkman y col, 1991; Buscaglia y col, 2006). Asimismo, la transialidación es un equilibrio y puede ocurrir en ambas direcciones, hacia mucinas del parásito y hacia glicanos de la célula. Existen evidencias de que *T. cruzi* sería capaz de regular el grado de sialilación de las células hospedadoras para modificar el grado de adherencia y penetración (Giorgi y col. 2011; Freire de Lima y col. 2012). Además, *T. cruzi*, al transferir ácido siálico hacia linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados, impide la unión de dichas células a proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad, disminuyendo de esta manera la respuesta inmune específica dirigida contra los propios antígenos parasitarios. Estas evidencias remarcan el impacto de la remodelación del perfil de glicanos celulares en beneficio del parásito (Freire de Lima y col. 2010).

El efecto protector de Gal-1 observado en los ensayos *in vitro* también se observó en la infección experimental por *T. cruzi*, utilizando ratones transgénicos deficientes en el gen de Gal-1 y en ratones WT. Es importante mencionar que para estos ensayos se utilizaron tripomastigotes sanguíneos de las cepas Tulahuén y Brazil, los cuales presentaron diferente infectividad en la cepa de ratón utilizada, C57Bl/6. Los parásitos de la cepa Tulahuén, demostraron ser más infectivos que su contraparte de UDT I en la infección experimental de ratones, tanto WT, como deficientes en el gen de Gal-1 (*Lgals1*<sup>-/-</sup>). Esto difiere de las observaciones *in vitro*, en los que ambas cepas resultaron ser igualmente infectivas, y en las que Gal-1 ejercía un efecto protector de similar magnitud. Esta diferencia observada entre el modelo *in vivo* e *in vitro*, remarca la importancia del papel que cumple el sistema inmune en las infecciones parasitarias. La infección de los animales, independientemente del genotipo, con la cepa Tulahuén indujo una mortalidad cercana al 100% durante el primer mes; mientras que la cepa Brazil presentó una infección con menores manifestaciones durante la fase aguda; fenómeno que permitió analizar los posibles eventos que ocurrirían en etapas más cercanas a una infección crónica. En cuanto a las diferencias de susceptibilidad, entre los distintos sexos, pudo observarse una infección más severa en los machos que en las hembras, independientemente de la cepa utilizada, en concordancia con lo observado por otros autores (E. De Souza y col. 2001; Schuster y col. 2001; Micucci y col. 2010).

En este trabajo de Tesis se demostró que la ausencia de Gal-1 incrementó los niveles de parasitemia de los animales infectados, tanto con parásitos de la cepa Tulahuén, como de la cepa Brazil. Para el caso de las hembras infectadas con esta última cepa, nunca se desarrollaron parasitemias lo suficientemente altas como para observarse diferencias.

En cuanto a las curvas de Kaplan Meier, hubo un bajo porcentaje de decesos de los animales durante los casi tres meses de infección de la cepa Brazil, para ambos sexos. Por el contrario, se observó alta mortalidad para la infección con parásitos de la cepa Tulahuén, siendo más relevante en los ratones hembra *Lgals1*<sup>-/-</sup>, respecto de su contraparte de tipo salvaje; no se encontraron diferencias significativas, al comparar entre los animales machos de los distintos genotipos.

La anatomía patológica del músculo cardíaco durante la infección fue concordante con los resultados obtenidos a partir de los valores de parasitemias, y las curvas de muerte. Tanto los ratones *Lgals1*<sup>-/-</sup> machos como hembras infectados con tripomastigotes de la cepa Tulahuén, presentaron mayores parasitismos que sus contrapartes no transgénicas. En músculo esquelético no se observaron diferencias entre los distintos genotipos. Este hecho podría explicarse, considerando que distintas cepas de *T. cruzi* pueden tener tropismo preferencial por un determinado órgano, y no necesariamente por otros (Andrade y col. 1999; Camandaroba y col. 2006; Pérez y col. 2014; Esper y col. 2015).

Basados en estudios previos, esperaríamos que el aumento del parasitismo en tejidos de los ratones *Lgals1*<sup>-/-</sup> estuviera acompañado de una fuerte respuesta inflamatoria (Tarleton y col. 1999). Sobre todo, considerando que existen trabajos que destacan el rol anti-inflamatorio de Gal-1, y remarcan que su ausencia es un factor que bajo ciertas condiciones, induce al desarrollo de enfermedades autoinmunes (Rabinovich y col. 1999; Camby y col. 2006; Starosom y col. 2012). Contrariamente, se observó un mayor índice de inflamación en los animales WT que en los animales *Lgals1*<sup>-/-</sup>, en corazón de ratones hembras, y en músculo esquelético de los machos. Existe bibliografía que describe efectos similares en ratones con inmunodeficiencias genéticas o adquiridas, remarcando que el menor índice de inflamación observado en tejidos podría deberse a algún tipo de regulación diferencial de la respuesta inmune entre ratones *Lgals1*<sup>-/-</sup> y WT (Tarleton y col. 1992, 1994, 1996). Bajo las condiciones experimentales de este trabajo de Tesis, la ausencia de Gal-1, parecería hacer al sistema inmune menos eficaz para generar una respuesta inflamatoria capaz de controlar a la infección.

Los cortes histológicos de los órganos de animales infectados con la cepa Brazil, no mostraron la presencia de nidos parasitarios, y las reacciones inflamatorias no diferían con las de los animales sin infectar. La ausencia de nidos parasitarios es un fenómeno descrito en la

bibliografía para infecciones experimentales murinas crónicas e indeterminadas (Laguens y col. 1981; Bustamante y col. 2005).

Los registros electrocardiográficos de los animales infectados con tripomastigotes de la cepa Brazil, a los dos tiempos analizados fueron patológicos, ya que se detectaron depresiones en el segmento ST e inversión de onda T, aunque prácticamente no se observaron diferencias entre los distintos grupos. La escasa inflamación y ausencia de nidos parasitarios en el momento de recolección de los órganos, cronológicamente cercano al día 95 post-infección, se corresponderían con una disminución de los signos de alteración cardiológicas en etapas tardías de la infección experimental.

El conjunto de los resultados parecerían enfatizar que el efecto protector de Gal-1 ocurre en las etapas tempranas de la infección, y que estaría relacionado con la infectividad de la cepa parasitaria y la susceptibilidad intrínseca del animal a la infección experimental por *T. cruzi*. Siguiendo este razonamiento, Gal-1 no mostró efecto protector en las hembras (menos susceptibles a la infección) infectadas con tripomastigotes de la cepa Brazil (menos virulenta); probablemente mecanismos independientes de Gal-1 fueron suficientes para controlar la infección. Cuando se infectó a los machos (más susceptibles) con la misma cepa se observó un efecto protector que se manifestó solamente en el día del pico de parasitemia. En la infección con la cepa Tulahuén (más virulenta), se observó un notorio efecto de protección por parte de Gal-1 en los ratones hembras, detectándose diferencias significativas entre los genotipos de tipo salvaje y *Lgals1*<sup>-/-</sup>. Sin embargo, en los animales machos hubo una disminución en las parasitemias pero al ser el género más susceptibles, el efecto de Gal-1 podría no ser suficiente para modular la infección y evitar la mortalidad de casi el 100% de los animales.

Es interesante destacar las observaciones realizadas por Poncini y col. (2015), en los que la infección con tripomastigotes de la cepa RA por vía intradermoplantar demostraron una menor susceptibilidad hacia el desarrollo de infecciones letales en los ratones *Lgals1*<sup>-/-</sup>, respecto de los animales WT. A pesar que estos resultados parecen ser opuestos a los presentados en este trabajo de Tesis, los mismos refuerzan la hipótesis de que Gal-1 actuaría modulando la infección, y remarcando la importancia de la vía de inoculación en la aparición de diferentes alteraciones cardiacas asociadas a la infección. En este sentido, la vía intraperitoneal implica una vía rápida de infección, en la que los parásitos llegan rápidamente al corazón, mientras que en la vía intradermoplantar, los parásitos deben atravesar en primer lugar el músculo esquelético, antes de llegar al tejido cardíaco. En este sentido, una vía rápida

sería letal sin un control temprano de la infección en el órgano blanco, mientras que la vía intradermoplantar permitiría una adecuada acción de otros mecanismos más lentos, aunque persistentes de la respuesta inmune, algunos de ellos exacerbados por la ausencia de regulación de Gal-1.

El análisis del glicofenotipo expresado en la superficie de los tripomastigotes no permitió explicar la diferencia de infectividad entre ambos linajes. Los resultados sólo mostraron una diferencia significativa en la unión de la lectina SNA a glicoconjugados de parásitos de la cepa Brazil, es decir la presencia de ácido siálico en unión  $\alpha$ 2-6. A pesar de lo observado, *T. cruzi* no tiene la capacidad de sintetizar ácido siálico, y la actividad trans-sialidasa inserta este sacárido en posición  $\alpha$ 2-3 de residuos de galactosa libre, de mucinas. Hasta el momento, no se ha descrito la existencia de una trans-sialidasa  $\alpha$ 2-6, ni de una vía metabólica que le permita a *T. cruzi* sintetizar ácido siálico. Sin embargo, un trabajo reciente del grupo de Tanowitz, demostró que *T. cruzi* puede adquirir fragmentos de membrana de su hospedador a través del mecanismo de trogocitosis (Mukherjee y col. 2015), lo cual podría explicar la presencia de este monosacárido en la membrana de los parásitos de ambas cepas. Existen diversos trabajos en los que se demuestra que la presencia de ácido siálico aumenta la patogenicidad de diversos organismos, como en el caso de la infección del hongo *Aspergillus fumigatus* a la mucosa pulmonar; en este caso por aumentar la adhesión a la fibronectina de la lámina basal del hospedador (Wasylnka y col. 2001; Varki y col. 2012). Otro ejemplo es el de algunos estreptococos del grupo B, en el que el ácido siálico es un componente de la cápsula, y responsable de inhibir la activación del complemento, o el de *Pseudomonas aeruginosa*, en el que se utiliza la interacción de sialoglicoconjugados con Siglecs de neutrófilos para inhibir el estallido respiratorio (Wessels y col. 1992; Khatua y col. 2012). Es posible que la menor presencia de ácido siálico en posición  $\alpha$ 2-6, en la membrana de los tripomastigotes de la cepa Brazil respecto de Tulahuén contribuya a la menor infectividad de esta cepa en los experimentos *in vivo*, y que esté involucrado algún componente del sistema inmune. De esta manera también se explicaría que no se hayan observado diferencias en la infección de las células cardíacas por ambos linajes en los experimentos *in vitro*. Sin embargo, es necesario continuar esta línea de investigación para poder validar la hipótesis planteada.

Otro factor que podría explicar la diferencia de infectividad *in vitro* e *in vivo* sería la capacidad de *T. cruzi* de modular el glicofenotipo de las células cardíacas para disminuir unión de Gal-1. La modificación del glicofenotipo podría tener un efecto diferente para

distintas lectinas, y así un patrón de glicanos que dificultara la unión de Gal-1, podría igualmente tener un menor efecto en la unión de Gal-3, que como se mencionó anteriormente, es una molécula facilitadora de la infección. Esto es así, porque si bien, tanto Gal-3 como Gal-1 unen glicanos que presentan lactosamina, existen algunas diferencias relacionadas a su unión. Gal-1 une lactosaminas terminales, y la presencia de ácido siálico en posición  $\alpha$ 2-6 interfiere con esta unión, mientras que Gal-3 puede unirse a lactosaminas en posiciones internas de la cadena, y además tiene una especificidad mayor por polilactosaminas y por sustituciones en el motivo no reductor (galactosa) de este sacárido. Este hecho permite que existan diferencias en la especificidad de unión. Además, el hecho que Gal-3 sea pentamérica, y Gal-1 dimérica, también podría modificar el tipo de malla formada por una lectina respecto de la otra (Van Kooyk y Rabinovich. 2008; Rabinovich y col. 2009; Vasta, 2012).

Para analizar el rol de Gal-1 en la patogénesis de la CCC, debemos considerar que es una patología multifactorial y que el paradigma actual se basa en la persistencia parasitaria y en la respuesta inmune generada por el hospedador, como factores importantes en la aparición de la enfermedad (Gironés y col. 2004; Dutra y col. 2009; Nagajyothi y col. 2012; Viotti y col. 2014; Healy y col. 2015). En este sentido, ya sea que analicemos la aparición de la enfermedad desde la hipótesis del daño cardíaco generado por componentes del sistema inmune o por la acción directa del parásito, una baja carga parasitaria, retrasará la aparición de sintomatología cardíaca (Healy y col. 2015). Por lo tanto, Gal-1 podría actuar como una molécula protectora de la célula contribuyendo a disminuir las parasitemias en la etapa inicial, y así retrasando el pasaje de la etapa crónica asintomática a la etapa de CCC. A su vez la liberación de Gal-1 por la ruptura de las células infectadas podría actuar como un factor capaz de contribuir a un efectivo control de la enfermedad en la etapa aguda. Por otro lado, la capacidad del parásito de modular el glicofenotipo de las células del hospedador hacia una conformación menos permisiva a la acción de Gal-1, podría servirle al parásito como una estrategia para limitar la acción de esta lectina, y también podría contribuir a la aparición de sintomatología. Montpetit y col. (2009), demostraron que la glicosilación aberrante de cardiomiocitos alteraba la conductividad eléctrica, induciendo arritmias, disminución de la velocidad de conducción e hiporreflexia, todos síntomas observados en los pacientes que padecen CCC.

Por otro lado, la desregulación de citoquinas, en especial el aumento de la secreción de citoquinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  estaría involucrada en el desarrollo de la patología cardíaca (Cunha-netto y col. 2005). TNF- $\alpha$  es también una citoquina importante en la infección murina experimental, que contribuye a aumentar la mortalidad en animales C57Bl/6, secundaria a la atrofia tímica (Rogerio y col. 2004; Pérez y col. 2005). A su vez, Gal-1 actúa como un regulador de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, y podría actuar en un segundo momento como regulador de la respuesta inmune. Sin embargo, debido a que la infección por la cepa Brazil fue de escasa magnitud, deberían realizarse experimentos bajo otras condiciones que nos permitieran corroborar esta hipótesis.

En conclusión, los resultados presentados en esta Tesis demostraron que Gal-1 inhibe la infección de células cardíacas por *T. cruzi* mientras que el parásito modifica el glicofenotipo de cardiomiocitos, posiblemente para disminuir la acción protectora de Gal-1. De esta manera, la modulación de la interacción entre Gal-1 y sus ligandos específicos en la célula cardíaca podría ser relevante en la aparición de las alteraciones cardíacas asociadas a la infección por *T. cruzi*.

Finalmente, los datos presentados en este trabajo de Tesis podrían ser de utilidad para evaluar la posible aplicación farmacológica de la administración de Gal-1 como coadyuvante de las actuales drogas antiparasitarias, Benznidazol y Nifurtimox, para utilizar dosis menores de estas drogas y así disminuir sus graves efectos adversos. Asimismo, se logró establecer la importancia de Gal-1 y su efecto protector de la célula cardíaca en las etapas tempranas de la infección experimental de ratones por *T. cruzi*; hallazgos que permiten profundizar sobre el conocimiento de aspectos básicos de la infección por *T. cruzi*. Los datos expuestos en esta Tesis podrían tener además implicancias en otras enfermedades causadas por otros microorganismos cuya infección involucren a corto o largo plazo alteraciones en el tejido cardíaco.

## **Bibliografía**

Abad-Franch F, Aguilar HM. **Control de la Enfermedad de Chagas en el Ecuador – Resumen ejecutivo.** OPS/OMS – Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2002.

Acosta AM, Santos-Buch CA. **Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*.** *Circulation*. 1985 Jun; 71(6):1255-61. PubMed PMID: 3922642.

Acosta-Rodríguez EV, Montes CL, Motrán CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA, Gruppi A. **Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection.** *J Immunol*. 2004 Jan 1;172(1):493-502.

Albareda MC, Laucella SA, Alvarez MG, Armenti AH, Bertochi G, Tarleton RL, Postan M. ***Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients.** *Int Immunol*. 2006 Mar;18(3):465-71.

Albareda MC, Olivera GC, Laucella SA, Alvarez MG, Fernandez ER, Lococo B, Viotti R, Tarleton RL, Postan M. **Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4+ T cells to immune senescence.** *J Immunol*. 2009 Sep 15;183(6):4103-8.

Alvarado-Tapias E, Miranda-Pacheco R, Rodríguez-Bonfante C, Velásquez G, Loyo J, Gil-Oviedo M, Mogollón N, Pérez-Aguilar MC, Recchimuzzi G, Espinosa R, Carrasco HJ, Concepción JL, Bonfante-Cabarcas RA. **Electrocardiography repolarization abnormalities are characteristic signs of acute chagasic cardiomyopathy.** *Invest Clin*. 2012 Dec;53(4):378-94.

Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. **Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice.** *Mol Biochem Parasitol*. 1999 May 25;100(2):163-72.

Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Bulkestra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers Jr LE, Fornaciari G, Alisson A 2004. **A 9,000-years record of Chagas disease.** *Proc Nat Acad Sci USA* 101: 2034-2039.

Alvarado-Otegui JA, Ceballos LA, Orozco MM, Enriquez GF, Cardinal MV, Cura C, Schijman AG, Kitron U, and Gürtler RE. **The sylvatic transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* in a rural area in the humid Chaco of Argentina.** *Acta Trop*. 2012 October ; 124(1): 79–86.

Alves MJ, Colli W. ***Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival.** *IUBMB Life*. 2007 Apr-May;59(4-5):274-9.

Andrade D, Serra R, Svensjö E, Lima AP, Ramos Junior ES, Fortes FS, Morandini AC, Morandi V, Soeiro MN, Tanowitz HB and Scharfstein J. ***Trypanosoma cruzi* invades host cells through the activation of endothelin and bradykinin receptors: a converging pathway leading to chagasic vasculopathy.** *Br J Pharmacol* (2012) 165(5):1333–47.

Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. ***Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations.** *Exp Parasitol*. 2002 Apr;100(4):269-75.

Araujo-Jorge TC, Waghabi MC, Hasslocher-Moreno AM, Xavier SS, Higuchi ML, Keramidias M, Bailly S, Feige JJ. **Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease myocardial pathology.** *J Infect Dis* 2002, 186:1823–1828

Barbosa HS and Meirelles MNL. **Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of *Trypanosoma cruzi*.** *Cell Struct Funct* (1995) 20(4):275–84. doi:10.1247/csf.20.275

Bartholomeu DC, de Paiva RM, Mendes TA, DaRocha WD, Teixeira SM. **Unveiling the intracellular survival gene kit of trypanosomatid parasites.** *PLoS Pathog*. 2014 Dec 4;10(12):e1004399. doi:10.1371/journal.ppat.1004399. eCollection 2014 Dec.

Barr SC, Warner KL, Kornreic BG, Piscitelli J, Wolfe A, Benet L, McKerrow JH. **A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*.** *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Dec;49(12):5160-1

Barrias ES, de Carvalho TM, De Souza W. ***Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation.** *Front Immunol*. 2013 Aug 1;4:186.

Barrionuevo P, Beigier-Bompadre M, Ilarregui JM, Toscano MA, Bianco GA, Isturiz MA, Rabinovich GA. **A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway.** *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):436-45.

Baum LG. **Burn control, an adipocyte-specific function for galectin-12.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 15;108(46):18575-6.

Bermejo DA, Jackson SW, Gorosito-Serran M, Acosta-Rodriguez E, Amezcua-Vesely MC, Sather BD, Singh AK, Khim S, Mucci J, Liggitt D, Campetella O, Oukka M, Gruppi A, Rawlings DJ. ***Trypanosoma cruzi* trans-sialidase initiates an ROR- $\gamma$ t-AHR-independent program leading to IL-17 production by activated B cells.** *Nat Immunol*. 2013 May; 14(5): 514–522.

Biancardi MA, Conca Moreno M, Torres N, Pepe C, Altchek J, Freilij H. **Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en 17 parajes del "Monte Impenetrable" de la Provincia del Chaco.** Medicina (B Aires). 2003;63(2):125-9.

Bilate AM, Cunha-Neto E. **Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2008 Mar-Apr;50(2):67-74. Review.

Bochner BS, Zimmermann N. **Role of siglecs and related glycan-binding proteins in immune responses and immunoregulation.** J Allergy Clin Immunol. 2015 Jan 12. pii: S0091-6749(14)01734-5. doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.031. [Epub ahead of print] Review..

Bonney KM, Engman DM. 2008. **Chagas Heart Disease Pathogenesis: One 280 mechanisms or Many?** Curr. Mol. Med. 8:510-18.

Briceño-León R. **Chagas disease and globalization of the Amazon.** Cad Saude Publica. 2007;23 Suppl 1:S33-40.

Brutus L, Castillo H, Bernal C, Salas NA, Schneider D, Santalla JA and Chippaux JP. **Detectable *Trypanosoma cruzi* parasitemia during pregnancy and delivery as a risk factor for congenital Chagas disease.** Am J Trop Med Hyg 2010;83:1044–7.

Burgos JM, Altchek J, Bisio M, Duffy T, Valadares HM, Seidenstein ME, Piccinali R, Freitas JM, Levin MJ, Macchi L, Macedo AM, Freilij H and Schijman AG. **Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease.** Int J Parasitol. 2007 Oct;37(12):1319-27. Epub 2007 May 10.

Burgos JM, Altchek J, Petrucelli N, Bisio M, Levin MJ, Freilij H and Schijman AG. **Molecular diagnosis and treatment monitoring of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* to twins of a triplet delivery.** Diagn Microbiol Infect Dis. 2009 Sep;65(1):58-61.

Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Duffy T, Cura C, Brusses B, Favalaro L, Leguizamon MS, Lucero RH, Laguens R, Levin MJ, Favalaro R, Schijman AG. **Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and Reactivation after Heart Transplantation.** Clin Infect Dis 2010 sep 1:51(5):485-95.

Buscaglia CA, Campo VA, Frasch AC and Di Noia JM. ***Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity.** Nature Reviews Microbiology, vol. 4, no. 3, pp. 229–236, 2006.

Bustamante JM, Rivarola HW, Fretes R, Paglini-Oliva PA. **Weekly electrocardiographic pattern in mice infected with two different *Trypanosoma cruzi* strains.** Int J Cardiol. 2005 Jul 10;102(2):211-7.

Calvet CM, Melo TG, Garzoni LR, Oliveira FO Jr, Neto DT, Maria N S L M, Meirelles L, Pereira MC. **Current understanding of the *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction.** Front Immunol. 2012 Oct 30;3:327

Camandaroba E, Thé TS, Pessina DH, Andrade SG. ***Trypanosoma cruzi*: clones isolated from the Colombian strain, reproduce the parental strain characteristics, with ubiquitous histotropism.** Int J Exp Pathol. 2006 Jun;87(3):209-17.

Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., Kiss, R. (2006) **Galectin-1: a small protein with major functions.** *Glycobiology* 16, 137R-157R

Cardinal MV, Marta A, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE. and Schijman AG, **Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina.** Int J Parasitol. 2008 November ; 38(13): 1533–1543

Carod-Artal FJ, Vargas AP, Melo M and Horan TA. **American trypanosomiasis (Chagas' disease): an unrecognised cause of stroke.** J Neurol Neurosurg Psychiatry 2003;74:516–518

Castro-Sesquen YE, Gilman RH, Yauri V, Angulo N, Verastegui M, Velásquez DE, Sterling CR, Martin D, Bern C. ***Cavia porcellus* as a Model for Experimental Infection by *Trypanosoma cruzi*.** Am J Pathol. 2011 July; 179(1): 281–288.

Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr. **HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte (1998).** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 2979-2984.

Colwell DD, Dantas-Torres F and Otranto D. **Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives.** Vet Parasitol. 2011 Nov 24;182(1):14-21

Croci, DO, Cerliani, JP, Dalotto-Moreno, T, Méndez-Huergo, SP, Mascanfroni, ID, Dergan-Dylon, S, Toscano, MA, Caramelo, JJ, García-Vallejo, JJ, Ouyang, J, Mesri, EA., Junttila, MR., Bais, C, Shipp, MA., Salatino, M, and Rabinovich, GA. (2014) **Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors.** Cell 156, 744-758

Croci DO, Salatino M, Rubinstein N, Cerliani JP, Cavallin LE, Leung HJ, Ouyang J, Ilarregui JM, Toscano MA, Domaica CI, Croci MC, Shipp MA, Mesri EA, Albini A, Rabinovich GA. **Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma.** J Exp Med. 2012 Oct 22;209(11):1985-2000.

Cummings RD, McEver RP. C-type Lectins. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. **Essentials of Glycobiology. 2nd edition.** Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1943/>

Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J. **Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient.** *Journal of Clinical Investigation.* 1996;98(8):1709-1712.

Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenuti L, Higuchi ML, Koyama NS, Silva JS, Kalil J, Liew CC. **Cardiac Gene Expression Profiling Provides Evidence for Cytokinopathy as a Molecular Mechanism in Chagas' Disease Cardiomyopathy.** *Am J Pathol.* 2005 Aug;167(2):305-13.

Cunha-Neto E, Teixeira PC, Nogueira LG, Kalil J. **Autoimmunity.** *Adv Parasitol.* 2011;76:129-52. doi:10.1016/B978-0-12-385895-5.00006-2. Review.

Cunha-Neto E, Chevillard C. **Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics.** *Mediators of Inflammation.* 2014;2014:683230. doi:10.1155/2014/683230.

Das Chagas Xavier SC, Rodrigues Roque AL, Dos Santos Lima V, Lima Monteiro KL, Rodrigues Otaviano JC, Coutinho Ferreira da Silva LF and Jansen AM. **Lower Richness of Small Wild Mammal Species and Chagas Disease Risk.** *PLoS Negl Trop Dis.* 2012 May; 6(5): e1647.

Davicino RC, Eliçabe RJ, Di Genaro MS, Rabinovich GA. **Coupling pathogen recognition to innate immunity through glycan-dependent mechanisms.** *Int Immunopharmacol.* 2011 Oct;11(10):1457-63.

De Boer RA, Yu L, van Veldhuisen DJ. **Galectin-3 in cardiac remodeling and heart failure.** *Curr Heart Fail Rep.* 2010 Mar;7(1):1-8.

De Boer RA, Lok DJ, Jaarsma T, van der Meer P, Voors AA, Hillege HL, van Veldhuisen DJ. **Predictive value of plasma galectin-3 levels in heart failure with reduced and preserved ejection fraction.** *Ann Med.* 2011 Feb;43(1):60-8

De Rissio AM, Riarte AR, Martín García M, Esteva MI, Quaglino M and Ruiz AM. **Congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Efficacy of its monitoring in an urban reference health center in a non-endemic area of Argentina.** *Am J Trop Med Hyg.* 2010 May;82(5):838-45.

De Souza EM, Rivera MT, Araújo-Jorge TC, de Castro SL. **Modulation induced by estradiol in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice.** *Parasitol Res.* 2001 Jul;87(7):513-20.

De Souza W. **From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality.** Kinetoplastid Biol Dis. 2002 May 31;1(1):3.

De Souza W, De Carvalho TM, Barrias ES. **Review on *Trypanosoma cruzi*: HostCell Interaction.** Int J Cell Biol. 2010; Epub 2010 Jul 29.

Del Puerto R, Nishizawa JE, Kikuchi M, Iihoshi N, Roca Y, Avilas C, Gianella A, Lora J, Velarde FU, Renjel LA, Miura S, Higo H, Komiya N, Maemura K, Hirayama K. **Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia.** PLoS Negl Trop Dis. 2010 May 18;4(5):e687.

Dell'Arciprete A, Braunstein J, Touris C, Dinardi G, Llovet I, Sosa-Estani S. **Cultural barriers to effective communication between Indigenous communities and health care providers in Northern Argentina: an anthropological contribution to Chagas disease prevention and control.** Int J Equity Health. 2014 Jan 29;13(1):6.

Dias P, Desplantez T, El-Harasis MA, Chowdhury RA, Ullrich ND, Cabestrero de Diego A, Peters NS, Severs NJ, MacLeod KT, Dupont E. **Characterisation of connexin expression and electrophysiological properties in stable clones of the HL-1 myocyte cell line.** PLoS One. 2014 Feb 28;9(2):e90266.

Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, Bello ZD, Velazquez E, Muñoz-Calderon A, Juiz NA, Basile J, Garcia L, Riarte A, Nasser JR, Ocampo SB, Yadon ZE, Torrico F, de Noya BA, Ribeiro I, Schijman AG. **Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples.** PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(1):e2000.

Dungel P, Teuschl AH, Banerjee A, Paier-Pourani J, Redl H, Kozlov AV. **Impact of mitochondria on nitrite metabolism in HL-1 cardiomyocytes.** Front Physiol. 2013 May 20;4:101.

Dutra WO, Menezes CAS, Villani FNA, Carneiro da Costa G, Morais da Silveira AB, d'Ávila Reis D, Gollob KJ. **Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 208-218, 2009

Epting CL, Coatesa BM, and Engmanb DE. **Molecular Mechanisms of Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*.** Exp Parasitol. 2010 November ; 126(3): 283–291.

Esper L, Talvani A, Pimentel P, Teixeira MM, Machado FS. **Molecular mechanisms of myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi*.** Curr Opin Infect Dis. 2015 Jun;28(3):246-52.

Fernandes MC, Cortez M, Geraldo Yoneyama KA, Straus AH, Yoshida N, Mortara RA. **Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains.** Int J Parasitol. 2007 Nov;37(13):1431-41. Epub 2007 May 21.

Fernandes MC, Cortez M, Flannery AR, Tam C, Mortara RA, Andrews NW. ***Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion.** J Exp Med. 2011 May 9;208(5):909-21.

Fernández GC, Ilarregui JM, Rubel CJ, Toscano MA, Gómez SA, Beigier Bompadre, M, Isturiz MA, Rabinovich GA, Palermo MS. **Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways.** Glycobiology. 2005 May;15(5):519-27. Epub 2004 Dec 15.

Fernández MS, Lestani EA, Cavia R and Salomón OD. **Phlebotominae fauna in a recent deforested area with American Tegumentary Leishmaniasis transmission (Puerto Iguazú, Misiones, Argentina): Seasonal distribution in domestic and peridomestic environments.** Acta Trop. 2012 Apr;122(1):16-23.

Freedman NJ and Lefkowitz RJ. **Anti- $\beta_1$ -adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation.** J Clin Invest. 2004 May;113(10):1379-82.

Freire-de-Lima L, Alisson-Silva F, Carvalho ST, Takiya CM, Rodrigues MM, Dos Reis GA, Mendonça-Previato L, Previato JO, Todeschini AR. ***Trypanosoma cruzi* subverts host cell sialylation and may compromise antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses.** J Biol Chem. 2010 Apr 30;285(18):13388-96.

Freire-de-Lima L, Oliveira IA, Neves JL, Penha LL, Alisson-Silva F, Dias WB and Todeschini AR. **Sialic acid: a sweet swing between mammalian host and *Trypanosoma cruzi*.** *Frontiers in Immunology* 2012;3:356.

Garcia ES, Genta FA, de Azambuja P, Schaub GA. **Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*.** Trends Parasitol 2010 Oct;26(10):499-505

Giddings OK, Eickhoff CS, Sullivan NL, Hoft DF. **Intranasal vaccinations with the trans-sialidase antigen plus CpG Adjuvant induce mucosal immunity protective against conjunctival *Trypanosoma cruzi* challenges.** Infect Immun. 2010 Mar;78(3):1333-8.

Giordanengo, L, Gea, S, Barbieri, G. And Rabinovich, G.A. **Anti-galectin-1 autoantibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection: differential expression of this  $\beta$ -galactosidase-binding protein in cardiac Chagas' disease.** Clin. Exp. Immunol. 2001; 124:266-273.

Giorgi ME, de Lederkremer RM. **Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite.** Carbohydr Res. 2011 Sep 6;346(12):1389-93.

Gironés N, Cuervo H, Fresno M. **Is there a pathogenic role of autoimmuneresponses in Chagas' disease?** Inmunología. 2004 Abril-Junio; Vol. 23, Núm 2: 185-199

Guhl F, Jamillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Cardenas-Arroyo F, Forniciari G 1999. **Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4.000 years old mummified human tissue from northern Chile.** *Am J Physiol Anthropol* 108: 625-635.

Gupta S, Bhatia V, Wen J, Wu Y, Huang YW, Huang MH and Garg NJ. ***Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes.** Free Radical Biol. & med.47 (2009) 1414:1421

Gürtler RE. **Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco Region: current challenges and possible approaches.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 July ; 104(Suppl 1): 52–59.

Healy C, Viles-Gonzalez JF, Sáenz LC, Soto M, Ramírez JD, d'Avila A. **Arrhythmias in Chagasic Cardiomyopathy.** Card Electrophysiol Clin. 2015Jun;7(2):251-268..

Hemmige V, Tanowitz H and Sethi A. ***Trypanosoma cruzi* infection: a review with emphasis on cutaneous manifestations.** Int J Dermatol. 2012 May ; 51(5): 501–508.

Hissa B, Duarte JG, Kelles LF, Santos FP, del Puerto HL, Gazzinelli- Guimarães PH, de Paula AM, Agero U., Mesquita ON, Guatimosim C, Chiari E, Andrade LO. **Membrane cholesterol regulates lysosome- plasma membrane fusion events and modulates *Trypanosoma cruzi* invasion of host cells.** *PLoS Negl Trop Dis* (2012) 6(3):e1583.

Humphreys DT, Hynes CJ, Patel HR, Wei GH, Cannon L, Fatkin D, Suter CM, Clancy JL, Preiss T. **Complexity of murine cardiomyocyte miRNA biogenesis, sequence variant expression and function.** *PLoS One*. 2012;7(2):e30933. doi: 10.1371/journal.pone.0030933. Epub 2012 Feb 3.

Illarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, Geffner JR and Rabinovich GA. **Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10.** *Nat. Immunol*. 2009 Sep;10(9):981-91. Epub 2009 Aug 9.

Institute for *Laboratory Animal* Research; National Research Council (2011). **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8<sup>th</sup> Edition**

Ito K, Stannard K, Gabutero E, Clark AM, Neo SY, Onturk S, Blanchard H, Ralph SJ. **Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment.** *Cancer Metastasis Rev.* 2012 Dec;31(3-4):763-78

Jiang Q, Ni B, Shi J, Han Z, Qi R, Xu W, Wang D, Wang DW, Chen M. **Down-regulation of ATBF1 activates STAT3 signaling via PIAS3 in pacing-induced HL-1 atrial myocytes.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Jul 4;449(3):278-83.

Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, Barillas-Mury C, Sacks DL, Valenzuela JG. **A role for insect galectins in parasite survival.** *Cell.* 2004 Oct 29;119(3):329-41.

Kao YH, Chen YC, Lin YK, Shiu RJ, Chao TF, Chen SA, Chen YJ. **FGF-23 Dysregulates Calcium Homeostasis and Electrophysiological Properties in HL-1 Atrial Cells.** *Eur J Clin Invest.* 2014 Jun 18. doi: 10.1111/eci.12296. [Epub ahead of print]

Kaplan D, Ferrari I, Lopez Bergami P, Mahler E, Levitus G, Chiale P, Hoebcke J, Van Regenmortel MHV, Levin MJ. **Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in Lupus.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94, 10301-10306.

Khatua B, Bhattacharya K, Mandal C. **Sialoglycoproteins adsorbed by *Pseudomonas aeruginosa* facilitate their survival by impeding neutrophil extracellular trap through siglec-9.** *J Leukoc Biol.* 2012 Apr;91(4):641-55. doi: 10.1189/jlb.0511260.

Kleshchenko YY, Moody TN, Vyacheslav AF, Ochieng J, Lima MF and Villalta F. **Human Galectin-3 Promotes *Trypanosoma cruzi* Adhesion to Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells.** *Infect. Immunol.* 2004 Nov;72(11):6717-21.

Kohatsu L, Hsu DK, Jegalian AG, Liu FT, Baum LG. **Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans.** *J Immunol.* 2006 Oct 1;177(7):4718-26.

Kornfeld R, Kornfeld S (1985) **Assembly of asparagine-linked oligosaccharides.** *Annu Rev Biochem* 54: 631–664.

Labovsky V, Smulski CR, Gómez K, Levy G, Levin MJ. **Anti-  $\beta$ 1-adrenergic receptor autoantibodies in patients with chronic Chagas heart disease.** *Clin Exp Immunol.* 2007 Jun;148(3):440-9.

Laguens RP, Meckert PC, Gelpi RJ. **Chronic Chagas disease in the mouse. I. Electrocardiographic and morphological patterns of the cardiopathy.** *Medicina (BAires).* 1981;41(1):35-9.

Lefranc F, Mathieu V, Kiss R. **Galectin-1-mediated biochemical controls of melanoma and glioma aggressive behavior.** World J Biol Chem. 2011 Sep 26;2(9):193-201.

Levin MJ, Kaplan D, Ferrari I, Arteman P, Vazquez M, Panebra A. **Humoral autoimmune response in Chagas disease: *Trypanosoma cruzi* ribosomal antigens as immunizing agents.** FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1993; 7:205-210.

Libby P, Alroy J, Pereira ME. (1986) **A neuraminidase from *Trypanosoma cruzi* removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells.** *J Clin Invest* 77:127–135.

Lingwood CA. **Glycosphingolipid functions.** Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Jul 1;3(7): a004788. Review. Erratum in: Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Sep;3(9):a011874.

Liu FT, Rabinovich GA. **Galectins as modulators of tumour progression.** Nat Rev Cancer. 2005 Jan;5(1):29-41. Review.

Lok DJ, Van Der Meer P, de la Porte PW, Lipsic E, Van Wijngaarden J, Hillege HL, van Veldhuisen DJ. **Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study.** Clin Res Cardiol. 2010 May;99(5):323-8.

Lopes Rocha F, Rodrigues Roque AL, Saab de Lima J, Carvalho Cheida C, Gemesio Lemos F, Cavalcanti de Azevedo F, Corassa Arrais R, Bilac D, Miraglia Herrera H, Moura M and Jansen AM. ***Trypanosoma cruzi* Infection in eotropical Wild Carnivores (Mammalia: Carnivora): At the Top of the *T. cruzi* Transmission Chain.** PLoS One. 2013; 8(7): e67463. Published online 2013 July 4

Lopez Bergami P, Scaglione J, Levin MJ. **Antibodies against the carboxyl-terminal end of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins are pathogenic.** FASEB J. 2001 Dec;15(14):2602-12.

López-Lucendo MF, Solís D, André S, Hirabayashi J, Kasai K, Kaltner H, Gabius HJ, Romero A. **Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding.** J Mol Biol. 2004 Oct 29;343(4):957-70.

Machado FS, Jelicks LA, Kirchhoff LV, Shirani J, Nagajyothi F, Mukherjee S, Nelson R, Coyle CM, Spray DC, de Carvalho AC, Guan F, Prado CM, Lisanti MP, Weiss LM, Montgomery SP, Tanowitz HB. **Chagas heart disease: report on recent developments.** Cardiol Rev. 2012 Mar-Apr;20(2):53-65.

Marques J, Mendoza I, Noya B, Acquatella H, Palacios I e Marques-Mejias M. **As Manifestações de ECG do Maior Surto da Doença de Chagas devido a Infecção Oral na América Latina.** Arq Bras Cardiol. 2013 Sep;101(3):249-54.

Medei, E, Pedrosa RC, Benchimol Barbosa PR, Costa PC, Hernández CC, Chaves EA, Linhares V, Masuda MO, Nascimento JH, Campos de Carvalho AC. **Human antibodies with muscarinic activity modulate ventricular repolarization: Basis for electrical disturbance.** Int J Cardiol. 2007 Feb 14;115(3):373-80.

Micucci LR, Bazán PC, Fauro R, Baez A, Lo Presti MS, Triquel MF, Paglini-Oliva PA, Rivarola HW. **Importance of host sex in the development of trypanosoma cruzi infection.** Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.2010;67(2):73-6.

Ming M, Ewen ME, Pereira ME. **Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway.** Cell. 1995 Jul 28;82(2):287-96.

Montpetit, ML, Stocker PJ, Schwetz TA, Harper JM, Norring SA, Schaffer L, North SJ, Jang-Lee J, Gilmartin T, Head SR, Haslam SM, Dell A, Marth JD and Bennett ES. **Regulated and aberrant glycosylation modulate cardiac electrical signaling.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Sep 22;106(38):16517-22.

Moody TN, Ochieng J, Villalta F. **Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3.** FEBS Lett. 2000 Mar 31;470(3):305-8.

Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ, Yusuf S; BENEFIT Investigators. **Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy.** N Engl J Med. 2015 Oct;373(14):1295-306.

Mukherjee S, Mukhopadhyay A, Andriani G, Machado FS, Ashton AW, Huang H, Weiss LM, Tanowitz HB. ***Trypanosoma cruzi* invasion is associated with trogocytosis.** Microbes Infect. 2015 Jan;17(1):62-70. doi: 10.1016/j.micinf.2014.10.009.

Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer PE, Mukherjee S, Lisanti MP, Weiss LM, Garg NJ, Tanowitz HB. **Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease.** Cell Microbiol. 2012 May;14(5):634-43. doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01764.x. Epub 2012 Feb 24. Review.

Noireau F, Diosque P, Jansen AM. ***Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts.** Vet Res. 2009 Mar-Apr;40(2):26. doi: 10.1051/vetres/2009009. Epub 2009 Mar 3.

Ohtsubo K and Marth JD. **Glycosilation in cellular Mechanisms of Health and Disease.** Cell 2006; 126:855-867.

Okumura CY, Baum LG, Johnson PJ. **Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis***. Cell Microbiol. 2008 Oct;10(10):2078-90.

Organización Panamericana de la Salud. **La enfermedad de Chagas**. A la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral. Buenos Aires: Fundación Mundo Sano, 2007.

Parada H, Carrasco HA, Añez N, Fuenmayor C and Inglessis I. **Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study**. Int J Cardiol 1997;60:49-54.

Paulick MG, Bertozzi CR. **The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins**. Biochemistry. 2008;47(27):6991-7000.

Perez CJ, Lymbery AJ, Thompson RC. **Chagas disease: the challenge of polyparasitism?** Trends Parasitol. 2014 Apr;30(4):176-82. doi:10.1016/j.pt.2014.01.008. Epub 2014 Feb 24. Review.

Pérez AR, Tamae-Kakazu M, Pascutti MF, Roggero E, Serra E, Revelli S, Bottasso, O. **Deficient control of *Trypanosoma cruzi* infection in C57BL/6 mice is related to a delayed specific IgG response and increased macrophage production of pro-inflammatory cytokines**. Life Sci. 2005 Sep 2;77(16):1945-59.

Pérez de Rosas AR, Segura EL And Garía BA. **Molecular phylogeography of the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* in Argentina**. Heredity (2011) 107, 71–79

Pineda MA, Cuervo H, Fresno M, Soto M, Bonay P. **Lack of galectin-3 prevents cardiac fibrosis and effective immune responses in a murine model of *Trypanosoma cruzi* infection**. J Infect Dis. 2015 Mar 24. pii: jiv185. [Epub ahead of print]

Pinto AY, Valente SA, Valente Vda C, Ferreira Junior AG e Rodrigues Coura J. **Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005**. Rev Soc Bras Med Trop. 2008 Nov-Dec;41(6):602-14.

Poncini CV, Ilarregui JM, Batalla EI, Engels S, Cerliani JP, Cucher MA, vanKooyk Y, González-Cappa SM, Rabinovich GA. ***Trypanosoma cruzi* Infection Imparts a Regulatory Program in Dendritic Cells and T Cells via Galectin-1-Dependent Mechanisms**. J Immunol. 2015 Oct 1;195(7):3311-24. doi: 10.4049/jimmunol.1403019.

Postan M, Bailey JJ, Dvorak JA, McDaniel JP, Pottala EW. **Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. III. Histopathological and electrocardiographical responses to chronic infection**. Am J Trop Med Hyg. 1987 Nov;37(3):541-9.

Punukollu G, Gowda R, Khan I, Navarro VS and Vasavada B. **Clinical aspects of the Chagas' heart disease**. Int J Cardiol. 2007 Feb 14;115(3):279-83.

Quintá HR, Pasquini JM, Rabinovich GA, Pasquini LA. **Glycan-dependent binding of galectin-1 to neuropilin-1 promotes axonal regeneration after spinal cord injury.** *Cell Death Differ.* 2014 Jun;21(6):941-55.

Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Taylor H, Riera CM, Hirabayashi J, Chernajovsky Y. **Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis.** *J Exp Med* 1999, 190:385e398

Rabinovich GA. **Galectin-1 as a potential cancer target.** *Br J Cancer.* 2005 Apr 11;92(7):1188-92. Review.

Rabinovich GA, Gruppi A. **Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease.** *Parasite Immunol.* 2005 Apr;27(4):103-14. Review.

Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS & Vasta GR. **Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices.** *Curr Opin Struct Biol.* 17, 513–520 (2007).

Rabinovich GA. and Toscano MA. **Turning ‘sweet’ on immunity: galectin–glycan interactions in immune tolerance and inflammation.** *Nat Rev Immunol.* 2009 May;9(5):338-52.

Rabinovich GA, Croci DO. **Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer.** *Immunity.* 2012 Mar 23;36(3):322-35.

Rajasagi NK, Suryawanshi A, Sehrawat S, et al. **Galectin-1 reduces the severity of herpes simplex virus induced ocular immunopathological lesions.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950).* 2012;188(9):4631-4643.

Rassi A, Jr., Rassi A, Little WC. **Chagas' heart disease.** *Clin Cardiol* 23:883–889 (2000).

Riarte A, Sinagra A, Lauricella M, Bolomo N, Moreno M, Cossio P, Arana R, Segura EL. **Chronic experimental infection by *Trypanosoma cruzi* in *Cebus apella* monkeys.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1995 Nov-Dec;90(6):733-40.

Ribeiro CH, López NC, Ramírez GA, Valck CE, Molina MC, Aguilar L, Rodríguez M, Maldonado I, Martínez R, González C, Troncoso R, Lavandero S, Gingras AR, Schwaeble W, Ferreira A. ***Trypanosoma cruzi* calreticulin: a possible role in Chagas' disease autoimmunity.** *Mol Immunol.* 2009 Mar;46(6):1092-9.

Ribeiro I, Sevcsik AM, Alves F, Diap G, Don R, Harhay MO, Chang S, Pecoul B. **New, improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients.** *PLoS Negl Trop Dis.* 2009 Jul 7;3(7):e484.

Rodrigues CM, Valadares HMS, Francisco AF, et al. **Coinfection with Different *Trypanosoma cruzi* Strains Interferes with the Host Immune Response to Infection.**Correa-Oliveira R, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010;4(10):e846.

Rodrigues Coura J, Junqueira ACV. **Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region.***Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 107(2): 145-154, March 2012

Rodrigues Coura J, Pinto Dias JC. **Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 31-40, 2009.

Rodríguez A, Martínez I, Chung A, Berlot CH, Andrews NW. **cAMP regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes.** *J Biol Chem* (1999) 274(24):16754–9.

Roggero E, Piazzon I, Nepomnaschy I, Perez A, Velikovskiy A, Revelli S, Bottasso O. **Thymocyte depletion during acute *Trypanosoma cruzi* infection in C57BL/6 mice is partly reverted by lipopolysaccharide pretreatment.** *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004 Jun 1;41(2):123-31.

Romano PS, Cueto JA, Casassa AF, Vanrell MC, Gottlieb RA, and Colombo MI. **Molecular and Cellular Mechanisms Involved in the *Trypanosoma cruzi*/Host Cell Interplay.** *IUBMB Life*. 2012 May ; 64(5): 387–396

Roque ALR, das Chagas Xavier S, da Rocha MG, Duarte ACM, D'Andrea PS, and Jansen AM. ***Trypanosoma cruzi* Transmission Cycle Among Wild and Domestic Mammals in Three Areas of Orally Transmitted Chagas Disease Outbreaks.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79(5), 2008, pp. 742–749

Sánchez Negrette O, Mora MC and Basombrío MA. **High Prevalence of Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection and Family Clustering in Salta, Argentina.** *Pediatrics* 2005;115:e668

Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, Izui S, Liu FT. **Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages.** *J Clin Invest*. 2003 Aug;112(3):389-97.

Sato S, St-Pierre C, Bhaumik P, Nieminen J. **Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs).** *Immunol Rev*. 2009 Jul;230(1):172-87.

Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, André S, Crijns HJ, Gribus HJ, Maessen J, Pinto YM. **Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction.** *Circulation*. 2004 Nov 9;110(19):3121-8. Epub 2004 Nov 1

Schenkman S, Jiang MS, Hart GW and Nussenzweig V. **A novel cell surface *trans*-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells.** *Cell* 65, 1117–1125 (1991).

Schmunis GA, Cruz JR. **Safety of the blood supply in Latin America.** *ClinMicrobiol Rev.* 2005 Jan;18(1):12-29. Review.

Schmunis GA. **Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Oct 30;102 Suppl 1:75-85.

Schnaar RL, Suzuki A, Stanley P. Glycosphingolipids. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. **Essentials of Glycobiology. 2nd edition.** Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1909/>

Schnaar RL. **Glycans and glycan-binding proteins in immune regulation: A concise introduction to glycobiology for the allergist.** *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Mar;135(3):609-15. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.057. Epub 2015 Jan 30. Review.

Schuster JP, Schaub GA. **Experimental Chagas disease: the influence of sex and psychoneuroimmunological factors.** *Parasitol Res.* 2001 Dec;87(12):994-1000.

Seropian IM, Cerliani JP, Toldo S, Van Tassell BW, Ilarregu JM, González GE, Matoso M, Salloum FN, Melchior R, Gelpi RJ, Stupirski JC, Benatar A, Gómez KA, Morales C, Abbate A and Rabinovich GA. (2013) **Galectin-1 controls cardiac inflammation and ventricular remodeling during acute myocardial infarction.** *Am. J. Pathol.* 182, 29-40

Silva-Barbosa SD, Savino W. **The Involvement of Laminin in Anti-Myocardial Cell Autoimmune Response in Murine Chagas Disease.** *Developmental Immunology.* 2000;7(2-4):293-301.

Smulski C, Labovsky V, Levy G, Hontebeyrie M, Hoebeke J, Levin MJ. **Structural basis of the cross-reaction between an antibody to the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2  $\beta$  protein and the human  $\beta$ 1-adrenergic receptor.** *FASEB J* 2006; 20:1396-1406.

Sosa-Estani S, Dri L, Touris C, Abalde S, Dell'Arciprete A. y Braunstein J. **Transmisión vectorial y congénita del *Trypanosoma cruzi* en Las Lomitas, Formosa.** *Medicina (B Aires)* 2009;69(4):424-30.

Souto-Padron, T, Reyes, MB, Leguizamon, S, Campetella, OE, Frasc, AC, de Souza, W, 1989. ***Trypanosoma cruzi* proteins which are antigenic during human infections are located in defined regions of the parasite.** *Eur. J. Cell Biol.* 50, 272–278

Starossom SC, Mascanfroni ID, Imitola J, Cao L, Raddassi K, Hernandez SF, Bassil R, Croci DO, Cerliani JP, Delacour D, Wang Y, Elyaman W, Khoury SJ, Rabinovich GA. **Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration.** *Immunity*. 2012 Aug 24;37(2):249-63.

Steimetz T, Gorustovich AA, Collet AM, Sanchez Negrette O, Segura MA, Basombrío MA, Guglielmotti MB. **Histologic and histomorphometric study of bone repair under acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats.** *Acta Odontol Latinoam*. 2012;25(2):193-200.

Suárez DC, Rey AP, Orduz ML, Prada RL, Tarazona Z. **Supervivencia de *Trypanosoma cruzi* en bebidas experimentalmente contaminadas.** Suárez DC, Rey AP, Ordu

Tan Y, Ichikawa T, Li J, Si Q, Yang H, Chen X, Goldblatt CS, Meyer CJ, Li X, Cai L, Cui T. **Diabetic downregulation of Nrf2 activity via ERK contributes to oxidative stress-induced insulin resistance in cardiac cells in vitro and in vivo.** *Diabetes*. 2011 Feb;60(2):625-33.

Tanowitz HB, Machado FS, Jelicks LA, Shirani J, de Carvalho AC, Spray DC, Factor SM, Kirchhoff LV, Weiss LM. **Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease).** *Prog Cardiovasc Dis*. 2009 May-Jun;51(6):524-39

Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. **Susceptibility of beta2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection.** *Nature*. 1992 Mar 26;356(6367):338-40.

Tarleton RL, Sun J, Zhang L, Postan M. **Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease.** *Infect Immun*. 1994; 62:1820–1829.

Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. ***Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease.** *Int Immunol*. 1996; 8: 13–22.

Tarleton RL, Zhang L. **Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?** *Parasitol Today*. 1999 Mar;15(3):94-9.

Te-Chuan Chou MD, Timothy K, Knilans MD. **Electrocardiography in Clinical Practice-Adult and Pediatric.** Fourth Edition. W.B. Saunders Company, 1996 ( Chapter 2: Atrial Abnormalities: pag 23).

Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W. **Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease.** *PLoS Negl Trop Dis* 6(8): e1749. (2012)

Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernández JD, Zwirner NW, Poirier F, Riley EM, Baum LG and Rabinovich GA. **Differential glycosilation of Th1, Th2 and Th-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death.***Nat Immunol.* 2007; 8(8):825-834.

Toso MA, Vial UF, Galanti N. **Transmisión de la Enfermedad de Chagas por Vía Oral.***Rev Med Chil.* 2011 Feb;139(2):258-66.

Tribulatti MV, Mucci J, Van Rooijen N, Leguizamón MS and Competella O. **The *trans*-Sialidase from *Trypanosoma cruzi* Induces Thrombocytopenia during Acute Chagas' Disease by Reducing the Platelet Sialic Acid Contents.***Infect Immun.* 2005 Jan;73(1):201-7.

Trischmann TM, and Bloom BR. (1980) *Trypanosoma cruzi*: ability of T-cell-enriched and -depleted lymphocyte populations to passively protect mice.*Exp. Parasitol.* 49, 225-232

Tyler KM, Engman DM. **The lifecycle of *Trypanosoma cruzi* revisited.***Int J Parasitol.* 2001 May 1;31(5-6):472-81.

Van Kooyk Y, Rabinovich GA, **Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptative immune responses.***Nature immunology.* 2008 Jun;9(6):593-601

Varki A, Gagneux P. **Multifarious roles of sialic acids in immunity.***Ann N Y Acad Sci.* 2012 Apr;1253:16-36. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06517.x. Review.

Vasta GR. **Roles of galectins in infection.***Nat Rev Microbiol.* 2009 Jun;7(6):424-38.

Vasta GR. **Galectins as Pattern Recognition Receptors: Structure, Function, and Evolution.***Adv Exp Med Biol.* 2012 ; 946: 21–36.

Villalta F, Madison MN, Kleshchenko YY, Nde PN, and Lima MF. **Molecular analysis of early host cell infection by *Trypanosoma cruzi*.** *Front Biosci.* 2008 May 1;13:3714-34

Viotti R, Alarcón de Noya B, Araujo-Jorge T, Grijalva MJ, Guhl F, López MC, Ramsey JM, Ribeiro I, Schijman AG, Sosa-Estani S, Torrico F, Gascon J; Latin American Network for Chagas Disease, NHEPACHA. **Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease.***Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Feb;58(2):635-9.

Waghbi MC, Keramidas M, Bailly S, Degrave W, Mendonça-Lima L, Soeiro Mde N, Meirelles Mde N, Paciornik S, Araújo-Jorge TC, Feige JJ. **Uptake of host cell transforming growth factor-beta by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion.***Am J Pathol.* 2005 Oct;167(4):993-1003.

Waghbi MC, Keramidas M, Feige JJ, Araujo-Jorge TC, Bailly S. **Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi***. *Cell Microbiol.* 2005 Apr;7(4):511-7.

Waghbi MC, Keramidas M, Calvet CM, Meuser M, de Nazaré C Soeiro M, Mendonça-Lima L, Araújo-Jorge TC, Feige JJ, Bailly S. **SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion**. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Aug;51(8):2905-10. Epub 2007 May 25.

Wasylnka JA, Simmer MI, Moore MM. **Differences in sialic acid density in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species**. *Microbiology.* 2001 Apr;147(Pt 4):869-77.

Wessels MR, Haft RF, Heggen LM, Rubens CE. **Identification of a genetic locus essential for capsule sialylation in type III group B streptococci**. *Infect Immun.* 1992 Feb;60(2):392-400.

White SM, Constantin PE, and Claycomb WC. **Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function**. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H823–H829, 2004

WHO Expert Committee. **Control of Chagas disease**. World Health Organ Tech Rep Ser. 2002;905:i-vi, 1-109.

WHO (2007) World Health Organization, **Report of the scientific working group on Chagas disease**.

Wiersma VR, de Bruyn M, Helfrich W, Bremer E. **Therapeutic potential of Galectin-9 in human disease**. *Med Res Rev.* 2013 Jun;33 Suppl 1:E102-26. doi:10.1002/med.20249. Epub 2011 Jul 26. Review.

Wynne de Martini GJ, Abramo Orrego L, de Rissio AM, Alvarez M, Mujica LP. (1980) **Culture of *Trypanosoma cruzi* in a monophasic medium. Application to large-scale cultures in fermentation processes**. *Medicina (B Aires)* 40, 109-114

Yang ML, Chen YH, Wang SW, Huang YJ, Leu CH, Yeh NC, Chu CY, Lin CC, Shieh GS, Chen YL, Wang JR, Wang CH, Wu CL, Shiau AL. **Galectin-1 binds to influenza virus and ameliorates influenza virus pathogenesis**. *J Virol.* 2011 Oct;85(19):10010-20.

Yang RY, Hsu DK, Yu L, Chen HY, Liu FT. **Galectin-12 is required for adipogenic signaling and adipocyte differentiation**. *J Biol Chem.* 2004 Jul 9;279(28):29761-6. Epub 2004 May 5.

Yang RY, Havel PJ, Liu FT. **Galectin-12: A protein associated with lipid droplets that regulates lipid metabolism and energy balance**. *Adipocyte.* 2012 Apr 1;1(2):96-100.

Yue TL, Wang C, Romanic AM, Kikly K, Keller P, DeWolf WE Jr, Hart TK, Thomas HC, Storer B, Gu JL, Wang X, Feuerstein GZ. **Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: A potential role of caspase-3.** *J Mol Cell Cardiol.* 1998 Mar;30(3):495-507.

Yoshida N. (2006). **Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*.** *An. Acad. Bras. Ciênc.* 78 87–111

Zabala JP. **Historia de la enfermedad de Chagas en Argentina: evolución conceptual, institucional y política.** *Hist Cienc Saude Manguinhos.* 2009 Jul;16 Suppl 1:57-74.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chirai E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. **A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI.** *Mem Inst Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro, Vol. 104(7): 1051-1054, November 2009

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. **The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications.** *Infection, Genetics and Evolution* 12 (2012) 240–253

Zúñiga E, Rabinovich GA, Iglesias MM, Gruppi A. **Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis.** *J Leukoc Biol.* 2001 Jul;70(1):73-9..

Zúñiga E, Gruppi A, Hirabayashi J, Kasai KI, Rabinovich GA. **Regulated expression and effect of galectin-1 on *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival.** *Infect Immun.* 2001 Nov;69(11):6804-12.

---

## **Abreviaturas**

ANF: Factor natriurético atrial

ANOVA: Análisis de la Varianza

BSA: Seroalbúmina bovina

CCC: cardiomiopatía chagásica crónica

CRD: Dominio de reconocimiento de carbohidratos

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño

Dpi: Días post-infección

ELISA: Ensayo Inmuno-adsorbente ligado a enzimas

Gal-1: Galectina-1

Gal-3: Galectina-3

GEL: Glicoesfingolípidos

GPI: Glicofosfatidil-inositol

HAI: Hemaglutinación indirecta

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IFN $\gamma$ : Interferón  $\gamma$

Ig: Inmunoglobulina

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL: Interleuquina

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido

LDH: Lactato deshidrogenasa

LPS: Lipopolisacárido

Neu5Ac: Ácido N-acetilneuramínico

Neu5Gc: Ácido N-glicolilneuramínico

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PI-3 quinasa: Fosfoinositol-3 quinasa

PIP<sub>3</sub>: [fosfatidil-inositol (3,4,5) trifosfato]

PKA: Proteín-kinasa A

PPR: Receptor de reconocimiento de patrones

Rc: Receptor

SEM: Error estándar de la media

Siglec: Lectinas del tipo de las inmunoglobulinas que unen ácido siálico

SFB: suero Fetal Bovino

SFI: Índice de fluorescencia específico (SFI),

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante  $\beta$

TMB: Tetrametilbencidina

TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

T<sub>reg</sub>: Células T regulatorias

UDT: Unidades discretas de tipificación

Los experimentos realizados durante el transcurso de este trabajo de Tesis dieron lugar a la siguiente publicación:

**Benatar AF**, García GA, Bua J, Cerliani JP, Postan M, Tasso LM, Scaglione J, Stupirski JC, Toscano MA, Rabinovich GA, Gómez KA. Galectin-1 Prevents Infection and Damage Induced by *Trypanosoma cruzi* on Cardiac Cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Oct 9;9(10):e0004148. doi: 10.1371/journal.pntd.0004148. eCollection 2015 Oct. PubMed PMID: 26451839; PubMed Central PMCID: PMC4599936.