

**Indice:**

Abreviaturas.....	3
Resumen.....	6
Abstract.....	8
Capítulo I: Introducción.....	10
Enfermedad de Chagas.....	11
Respuesta inmune anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	16
IL-6: Una citoquina con múltiples funciones.....	23
Inflamosoma e IL-1 $\beta$ .....	27
Síndrome Metabólico.....	34
Capítulo II: IL-6 promueve la polarización alternativa de macrófagos modulando la degradación de ATP y controla los efectos letales del estrés oxidativo en la infección experimental con <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	37
Objetivos.....	38
IL-6 determina el influjo de células inflamatorias al miocardio infectado.....	39
IL-6 determina el perfil de activación de macrófagos en tejido cardíaco infectado.....	42
IL-6 promueve la activación alternativa de macrófagos.....	46
Los animales deficientes en IL-6 presentan un incrementado estrés oxidativo.....	47
IL-6 regula la producción de óxido nítrico a través de la modulación de IL-1 $\beta$ .....	49
La inhibición de la producción de NO incrementa la sobrevida de animales deficientes en IL-6 infectados.....	52
Conclusiones parciales del Capítulo II.....	53
Capítulo III: IL-6 promueve sensibilización a la insulina controlando desórdenes metabólicos inducidos por la infección con <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	54
Objetivos.....	55
Los animales deficientes en IL-6 presentan insulinoresistencia aguda.....	56
El tejido adiposo visceral de animales deficientes en IL-6 presenta mayor número de macrófagos M1 e incrementado estrés oxidativo.....	57
La ausencia de IL-6 se asocia a incrementado daño renal.....	58
La deficiencia de IL-6 se asocia a una mayor expresión de TLR4 y de CD36 en células fagocíticas mononucleares circulantes.....	59
IL-6 regula la sensibilidad a la insulina inhibiendo la expresión de CD36.....	60
Conclusiones parciales del capítulo III.....	62
Capítulo IV: Interleuquina-6 revierte la disfunción de linfocitos citotóxicos en la enfermedad de Chagas humana.....	63
Objetivos.....	64

Los pacientes seropositivos presentan un menor número de linfocitos T CD8+ en sangre periférica .....	65
Los linfocitos T citotóxicos de pacientes chagásicos presentan mayor muerte celular y menor expresión de la molécula anti-apoptótica Bcl-2.....	66
Los pacientes chagásicos presentan una mayor frecuencia de leucocitos productores de óxido nítrico en sangre periférica .....	68
Los pacientes chagásicos presentan mayor nitración de residuos tirosina en las células T CD8+ .....	69
La nitración conduce a la disfuncionalidad de las células T citotóxicas.....	70
Los pacientes chagásicos presentan incrementados niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$ .....	73
La IL-6 previene la nitración de células T CD8+ y disminuye la producción de IL-1 $\beta$ por CMSP infectadas <i>in vitro</i> .....	73
Conclusiones parciales del Capítulo IV.....	77
Capítulo V: Los monocitos de los pacientes chagásicos presentan un fenotipo inflamatorio y mayor activación de las vías de respuesta a hipoxia .....	78
Objetivos .....	79
Los monocitos de pacientes seropositivos presentan mayor expresión de genes inducidos por HIF.....	80
La infección <i>in vitro</i> con <i>Trypanosoma cruzi</i> induce cambios glucolíticos en monocitos.....	81
La glucólisis es crucial para inducir un perfil inflamatorio de monocitos .....	82
Los monocitos de pacientes chagásicos presentan un fenotipo no clásico con funciones inflamatorias .....	82
Conclusiones parciales del Capítulo V.....	84
Capítulo VI: Discusión.....	85
Perspectivas: .....	94
Capítulo VII: Materiales y métodos.....	95
Parte I: Modelo Animal .....	96
Parte II: Experimentos con muestras humanas .....	100
Trabajos publicados durante el desarrollo de la presente tesis doctoral .....	103
Anexo I.....	104
Criterios de Inclusión y exclusión: .....	104
Bibliografía .....	105

**Abreviaturas**

2-DG: 2 deoxiglucosa

ADO: Adenosina

ADP: Adenosina difosfato

AMP: Adenosina monofosfato

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosina trifosfato

BMDM: Macrófagos derivados de médula ósea

CK: Creatin-kinasa total

CK-MB: Creatin-kinasa isoforma MB

CM: Memoria Central

CMSP: Células mononucleares de sangre periférica

CVB3: Virus de coxsackie B3

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño

Dpi: Días post-infección

ECAR: Tasa de acidificación extracelular

Ecto-5NT: Ecto-5 nucleotidasa

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

EM: células de memoria efectora

EMCV: Virus de encefalomiocarditis

EMRA: células de memoria terminalmente diferenciadas

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

ERO: Especies reactivas de oxígeno

Glut1: Transportador de glucosa 1

GPIs: Glicosilfosfatidilinositol

HAI: Hemaglutinación indirecta

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HIF: Factor inducible por hipoxia

IFI: Inmunofluorescencia

IFM: intensidad de fluorescencia media

IL-1 $\beta$ : interleuquina-1 beta

IL-6: interleuquina-6  
IL6KO: Deficientes en IL-6  
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible  
IR: Receptor de insulina  
LDL: Lipoproteínas de baja densidad  
L-NAME: N-Nitroarginina metil ester  
MDA: Malondialdehído  
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad  
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NEFA: ácidos grasos no esterificados  
NF-κB: Factor nuclear κB  
NK: Natural Killer  
NLR: Receptores tipo NOD  
NT: nitración de residuos tirosina  
OCR: Tasa de consumo de oxígeno  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
NO: Óxido nítrico  
OXPHOS: Fosforilación oxidativa  
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos  
PCR: Reacción en Cadena de Polimerasa  
PMA: acetato de forbolmiristato  
rhuIL-6: IL-6 humanarecombinante bioactiva  
rmIL-6: IL-6 murina recombinante bioactiva  
RRP: Receptores de reconocimiento de patrones  
SOCS3: Supresor de señalización de citoquinas 3  
TAV: Tejido adiposo visceral  
TBA: Acido tiobarbitúrico  
TCR: Receptor de célula T  
TFH: Células T cooperadoras foliculares  
TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina  
Th1: Células T cooperadoras tipo 1

TLR: Receptores tipo toll

TM: Trypomastigotes metacíclicos

TNF: Factor de necrosis tumoral

Treg: Células T regulatorias

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

WT: Animales salvajes C57BL/6

## **Resumen**

La producción de óxido nítrico (NO) es un mecanismo clave para la defensa contra los patógenos intracelulares, pero debe ser estrictamente controlada a los fines de evitar el daño tisular generado por un excesivo estrés oxidativo. En el presente trabajo de tesis describimos un nuevo mecanismo a través del cual interleuquina (IL)-6 regula la liberación de NO inducida en respuesta a la infección con el parásito cardiotrópico *Trypanosoma cruzi*. Empleando un modelo murino de infección con *Trypanosoma cruzi* encontramos que, en contraste con los ratones salvajes de la cepa C57BL/6 (WT), los deficientes en IL-6 (IL6KO) exhiben un gran aumento en los niveles plasmáticos de NO concomitante con mayor cantidad de IL-1 $\beta$  y monocitos inflamatorios circulantes. La alta producción de NO se asoció a un marcado incremento en los niveles cardíacos de malondialdehído (indicador de daño oxidativo) y en la tasa de apoptosis de células en miocardio. El tratamiento con un inhibidor de la producción de NO disminuye significativamente la mortalidad de animales infectados deficientes en IL-6. Además, el aumento del estrés oxidativo conllevó a desórdenes cardiovasculares evidenciado a través de un aumento en los niveles de glucosa y mayor daño renal en los animales deficientes infectados.

Por otro lado, estudiando las características funcionales y fenotípicas de las células circulantes en sangre periférica de pacientes chagásicos y células de donantes seronegativos infectadas experimentalmente con *T. cruzi*, encontramos que diferentes mecanismos reguladores alteraban las funciones efectoras de la población T citotóxica de pacientes seropositivos. Los leucocitos periféricos de pacientes chagásicos mostraron una mayor producción de NO concomitante con el aumento de la nitración de residuos tirosina en células T CD8+. Además, esta población citotóxica exhibió una mayor tasa de apoptosis, niveles más bajos de expresión de la cadena  $\zeta$  de TCR y de CD107a, un marcador de degranulación. Sorprendentemente, la estimulación con IL-6 de células mononucleares de sangre periférica obtenidas de donantes sanos infectadas *in vitro* con *T. cruzi*, redujo la nitración de células CD3+ CD8+ y aumentó la tasa de supervivencia. Además, el tratamiento de estos cultivos con un anticuerpo neutralizante de IL-6 aumentó el porcentaje de nitración de células T CD8+ inducida por *T. cruzi* y aumentó la liberación de NO. Estos resultados sugieren que la falta de respuesta de la población de células T citotóxicas observada en el establecimiento de la activación constante a largo plazo del sistema inmune podría ser revertida por las acciones pleiotrópicas de IL-6, ya que esta citoquina mejora su supervivencia y funciones efectoras.

Nuestros datos evidencian que IL-6 tiene un rol clave en regular la excesiva liberación de NO a través de la inhibición de IL-1 $\beta$ , y resaltan la importancia de conocer los efectos

pleiotrópicos de IL-6, considerando que esta citoquina es blanco terapéutico para diferentes patologías de naturaleza inmunológica.

## **Abstract**

The production of nitric oxide (NO) is a key mechanism of defense against intracellular pathogens, but it must be tightly controlled in order to avoid tissue damage generated by excessive oxidative stress. In the present thesis we describe a new mechanism through which interleukin (IL)-6 regulates the release of NO induced in response to *Trypanosoma cruzi* infection. Using a murine model of Chagas disease we found that, in contrast to C57BL/6 wild type (WT) mice, IL-6 deficient (IL6KO) mice exhibited a dramatic increase in plasma NO levels concomitant with a significantly higher amount of circulating IL-1 $\beta$  and inflammatory monocytes. Studies on mouse macrophages and human monocytes, revealed that IL-6 decreased LPS-induced NO production but this effect was abrogated in the presence of anti-IL-1 $\beta$  and in macrophages deficient in the NLRP3 inflammasome. The high NO production was associated with a marked increase in cardiac levels of malondialdehyde (marker of oxidative damage) and the rate of apoptosis of myocardial cells. Treatment with an inhibitor of NO production significantly decreased the mortality of infected mice. In addition, increased oxidative stress led to cardiovascular disorders evidenced by an increase in glucose levels and kidney damage in IL-6-deficient infected mice.

On the other hand, studying the functional and phenotypic characteristics of circulating cells in peripheral blood of chagasic patients and cells experimentally infected with *T. cruzi*, we found that different regulatory mechanisms impaired the effector functions of the cytotoxic T population from seropositive patients. Peripheral leukocytes from chagasic patients showed a higher production of NO concomitant with increased nitration of CD8<sup>+</sup> T-cells. In addition, this cytotoxic population exhibited a higher rate of apoptosis, lower levels of the TCR $\zeta$ -chain and CD107a expression, a degranulation marker. Surprisingly, IL-6 stimulation of *in vitro* infected peripheral blood mononuclear cells obtained from healthy donors blunted *T. cruzi*-induced nitration of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells, and increased their survival. In addition, the treatment of these cultures with an IL-6 neutralizing antibody increased the percentage of *T. cruzi*-induced CD8<sup>+</sup> T-cell nitration and raised the release of NO. These results suggest that the under-responsiveness of cytotoxic T cell population observed in the setting of long-term constant activation of the immune system could be reverted by the pleiotropic actions of IL-6, since this cytokine improves its survival and effector functions.

Our data demonstrate that IL-6 plays a key role in regulating the excessive release of NO through inhibition of IL-1 $\beta$ , and emphasize the importance of knowing the pleiotropic effects of

IL-6, considering that this cytokine is a therapeutic target for different immunological pathologies.

## **Capítulo I:**

### Introducción

## Enfermedad de Chagas

### ***Epidemiología:***

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana representa un importante problema de salud pública no sólo en América Latina donde es endémica en 21 países. Como consecuencia de la migración entre continentes, dicha enfermedad se ha diseminado hacia áreas como Europa, América del Norte, Japón, Australia, entre otras <sup>1,2</sup>. Se estima que la infección con *Trypanosoma cruzi*, el parásito causal de la enfermedad de Chagas afecta entre 6 y 7 millones de personas en el mundo, y aproximadamente 7.000 personas mueren anualmente, convirtiendo a la cardiopatía chagásica en la principal causa de enfermedad cardiovascular infecciosa a nivel mundial <sup>3,4,5</sup>.

Ya que alrededor del 30% de los pacientes desarrollará complicaciones cardíacas, esta enfermedad constituye un importante problema para la salud pública, por las consecuencias sociales y laborales para los afectados y por el alto costo que representa para los servicios de salud el manejo de los pacientes. Sin embargo, hay medidas de prevención eficaces que permitirían controlar este problema: la educación sanitaria, el control de los vectores, el diagnóstico precoz en la fase aguda, y el control de las embarazadas y bancos de sangre. En Argentina se calcula que hay alrededor de 2 millones de infectados, que podrán presentar alteraciones cardíacas de distinto grado a lo largo de su vida. En zonas endémicas, no tratadas con insecticidas, la mayor incidencia de la enfermedad de Chagas se evidencia antes de los 14 años, sobre todo en menores de 5 años.

La provincia de Córdoba es considerada por el Ministerio de Salud de la Nación en situación de alto riesgo por la transmisión vectorial, ya que existe una reemergencia de esta vía de contagio por un aumento de la infestación domiciliar y una alta seroprevalencia en grupos vulnerables <sup>6</sup>.

La enfermedad presenta diferentes vías de transmisión:

- Vectorial: por medio de la picadura del vector triatomino popularmente conocido como vinchuca.
- Vertical: Transmisión de madre a hijo.
- Oral: por la ingestión de bebida o comida contaminada con heces de triatomino infectado.
- Por transfusión de sangre o trasplante de órgano de una persona infectada.

La transmisión vectorial es la principal forma de infección en humanos, siendo la especie *Triatoma infestans* el insecto vector más común de la enfermedad en los países de América del Sur. La “vinchuca” reside en ambientes peri-domésticos de casas precarias en áreas rurales, y debido a la frecuente infección en regiones y comunidades postergadas, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha clasificado como una enfermedad tropical olvidada <sup>7,8</sup>. La transfusión sanguínea es la principal causa de transmisión en países no endémicos, y la razón por lo cual se ha implementado el análisis en los donantes en los bancos de sangre, mientras que la transmisión transplacentaria ocurre en el 0,5% de los casos <sup>9-11</sup>. A pesar de que el 90% de las personas adquieren la patología por picadura del vector, la transmisión oral emerge en los últimos años como la principal vía de transmisión en el Amazonas donde el control peri-doméstico e intra-domiciliario del triatomino ha resultado efectivo. Entre 2000 y 2010 más de 1000 casos agudos fueron reportados en Brasil; de ellos 776 han sido atribuidos a la ingestión de bebida o comida infectada <sup>12</sup>.

El parásito *Trypanosoma cruzi* presenta un ciclo de vida complejo, siendo la vinchuca y los mamíferos huéspedes intermediarios en la cadena de transmisión vectorial (Figura 1). Posee cuatro estadios morfológicos: epimastigotes, trypomastigotes metacíclicos (TM), amastigotes y trypomastigotes. Los trypomastigotes que circulan en la sangre del mamífero (animal o humano) infectado son ingeridos por el insecto hematófago vector. Los trypomastigotes se transforman en epimastigotes que se dividen por fisión binaria, luego en TM sin capacidad replicativa en el intestino y posteriormente se depositan en las heces del vector. La transmisión natural a un nuevo huésped ocurre cuando las heces cargadas de parásitos toman contacto con las membranas mucosas orales o nasales, la conjuntiva o heridas de la piel (que pueden ser causadas por la misma picadura del vector). Una vez en el mamífero, los trypomastigotes invaden macrófagos y/o células epiteliales circundantes a la zona de lesión del huésped y se transforman en la forma replicativa intracelular o amastigotes, que luego de numerosos ciclos de fisión binaria, lisan la célula liberándose al torrente sanguíneo trypomastigotes con capacidad de invadir otras células de diferentes tejidos blanco.

### Presentación Clínica

La enfermedad presenta inicialmente una fase aguda (fatal para el 2 al 8% de las personas infectadas) que dura hasta 2 meses y a pesar de que en el 95% de los casos es asintomática, puede manifestar síntomas no específicos como fiebre, mialgias, adenopatías, esplenomegalia y/o una inflamación característica en el sitio de ingreso de *T. cruzi* cuando la transmisión es vectorial, que en la conjuntiva del ojo se presenta como el signo de Romaña y en la piel se denomina Chagoma de inoculación<sup>13,14</sup>. En el caso de la infección adquirida por vía oral, los signos y síntomas clínicos son similares a los descritos previamente con ciertas peculiaridades: edema de extremidades y facial, dolor abdominal, hemorragia e incluso shock<sup>15</sup>. Durante la fase aguda la carga de parásitos en sangre presenta un incremento y puede ser detectada por examinación directa de sangre periférica en microscopio o por reacción en cadena de polimerasa (PCR). En respuesta a la proliferación del parásito, el sistema inmune se activa resultando en una dramática reducción de la carga parasitaria con el subsecuente control de la infección. Los individuos después progresan a la fase crónica asintomática (o indeterminada) de la enfermedad que puede durar desde meses a décadas. Sólo entre el 10 y el 40% de los pacientes progresan al estadio crónico sintomático, presentando patología cardíaca o en el tracto digestivo.

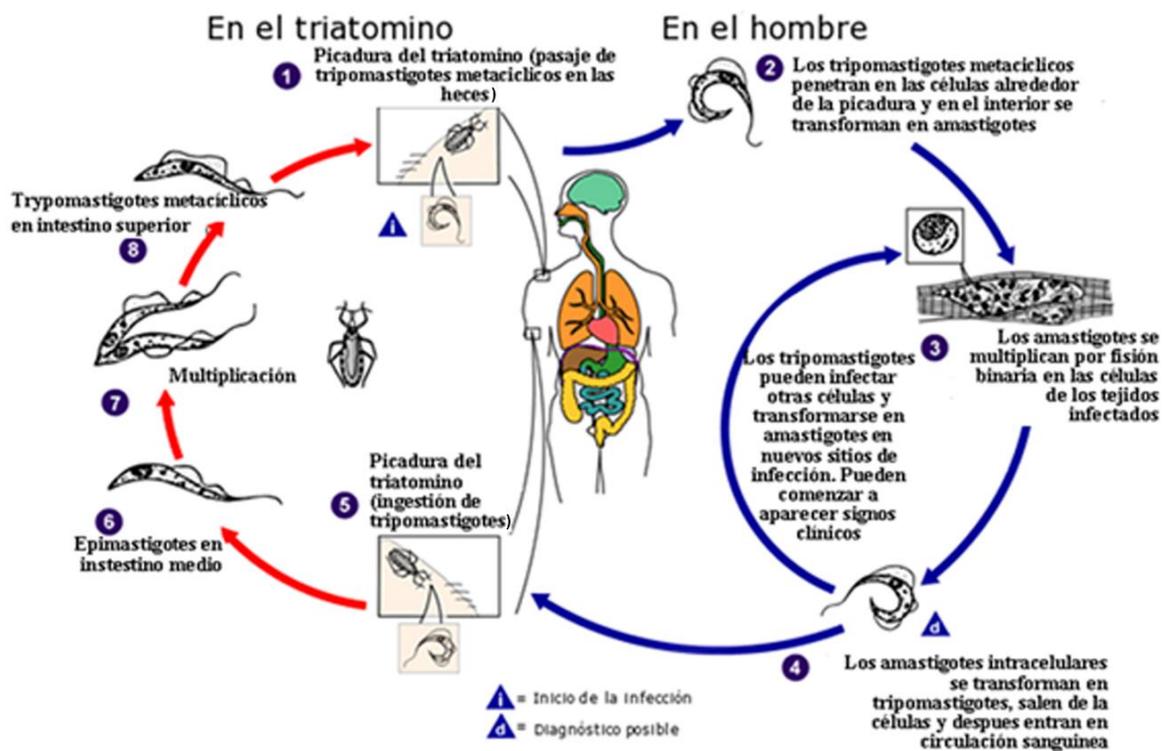
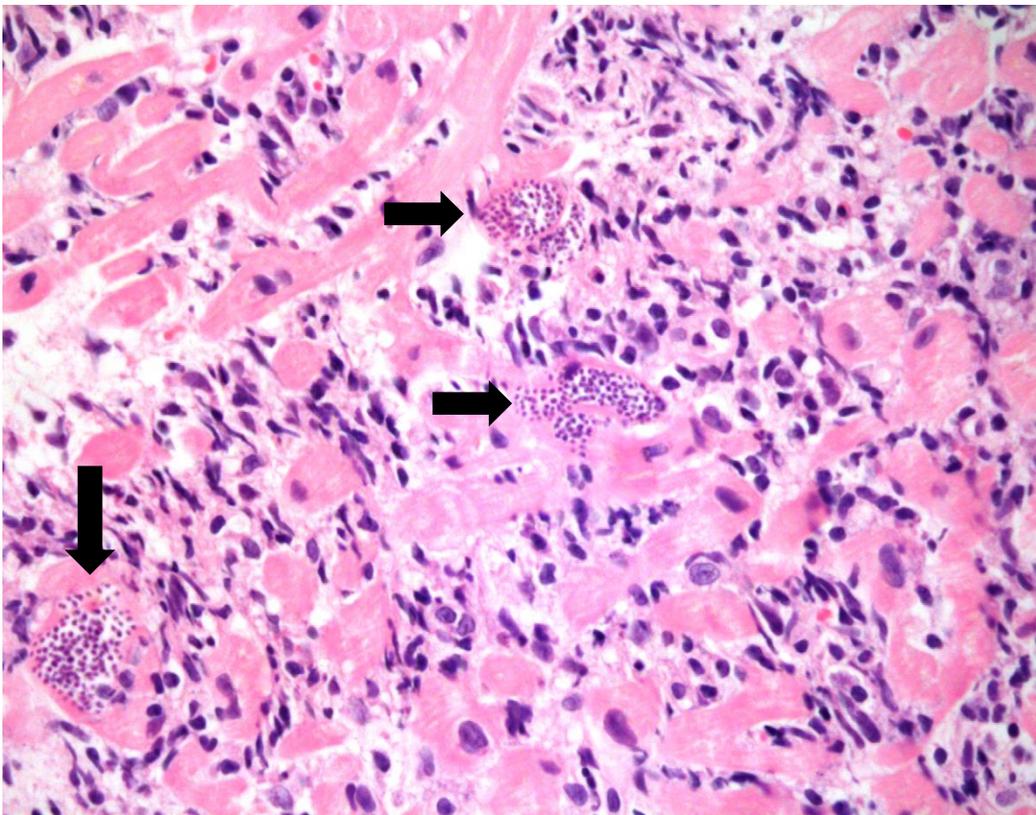


Figura 1: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

Adaptado de [www.who.int/tdr/diseases/chaqas/default.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/chaqas/default.htm)

La presentación clínica tiene formas regionalizadas. En este sentido existen áreas que incluyen a Argentina donde la enfermedad crónica se manifiesta con cardiomiopatía mientras que en otras zonas endémicas la presentación clínica implica lesiones a nivel gastrointestinal y del sistema nervioso central. Esta diferencia en las manifestaciones clínicas sería producto de la diversidad de las poblaciones y cepas del parásito conjuntamente a la diversidad genética del huésped <sup>13</sup>.

Así, en nuestro país el parásito presenta un fuerte tropismo por las células cardíacas (Figura 2) donde reside por años evitando la directa destrucción por el sistema inmune y perpetuando la infección <sup>13,14,16</sup>. Aunque las bases de este tropismo son actualmente desconocidas, está claro que el establecimiento de la infección en miocardio a largo plazo es fundamental para la patogénesis de la enfermedad de Chagas.



**Figura 2: Nidos de amastigotes de *T. cruzi* en células cardíacas humanas.**

Corte histológico representativo de tejido cardíaco humano obtenido de un paciente con cardiopatía chagásica que presentó reactivación luego del tratamiento inmunosupresor post-transplante. 400X. Las flechas negras indican los nidos de amastigotes.

La etiología de las lesiones patológicas de la enfermedad de Chagas es controvertida <sup>17-19</sup>. A pesar de que durante muchos años se propuso que la enfermedad de Chagas presentaba un fuerte compromiso autoinmune <sup>20</sup>; en la actualidad numerosos reportes apoyan la hipótesis de

que el *T. cruzi* y sus antígenos persisten en los órganos blanco, y serían así estímulo constante de la respuesta inflamatoria crónica que resulta en el daño tisular<sup>21-23</sup>, abalando la hipótesis de que los mecanismos que posibilitan la persistencia del parásito y la sobrevivencia de los cardiomiocitos durante la enfermedad de Chagas son determinantes en el progreso de la infección así como en la severidad de la enfermedad.

### ***Diagnóstico, tratamiento y control de la enfermedad de Chagas***

El tratamiento etiológico tiene como objetivos: curar la infección, prevenir lesiones viscerales y disminuir la posibilidad de transmisión (transplacentaria, transfusional) del parásito. La presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* (serología reactiva o positiva) antes de los 8 meses de vida es debida frecuentemente a transferencia de anticuerpos maternos y no a enfermedad congénita, y su ausencia no implica ausencia de infección. Por lo tanto, el diagnóstico final sólo podrá realizarse mediante métodos directos (observación de parásitos en sangre) antes de los 10 meses o mediante métodos serológicos (2 test positivos: Hemaglutinación indirecta-HAI-, enzimoimmunoensayo-ELISA- o inmunofluorescencia indirecta-IFI-) a partir del décimo mes de vida.

Se recomienda el tratamiento específico para:

- Todos los pacientes en fase aguda
- Pacientes menores de 15 años
- Pacientes inmunodeficientes con reactivación (VIH, post-transplante, enfermedades autoinmunes)
- Accidentes de laboratorio o quirúrgico

Es importante evaluar el tratamiento de los pacientes crónicos, ya que hay evidencias de que el tratamiento específico previene las complicaciones en este grupo de pacientes.

Las drogas utilizadas y provistas por el Programa Nacional de Chagas son Benznidazol y Nifurtimox. El Benznidazol se indica en dosis de 5-7 mg/Kg/día vía oral, dividido en dos tomas diarias, después de las comidas, durante 60 días. El Nifurtimox se indica en dosis de 8-10 mg/Kg/día en adolescentes y adultos y 10-12 mg/Kg/día en lactantes y niños, dividido en tres tomas después de las comidas, durante 60 días. Están contraindicadas en pacientes con enfermedad neurológica, hepática o renal severa, en el embarazo y en la lactancia.

Sin embargo, la baja adherencia al tratamiento reside principalmente en la duración y en los numerosos efectos adversos que presentan las drogas utilizadas. Durante las primeras dos

semanas de tratamiento pueden aparecer náuseas, dolores abdominales, cefaleas, mareos y erupciones cutáneas. Entre otros efectos adversos figuran la leucopenia y, en casos raros, la agranulocitosis. Los pacientes deben ser estrictamente controlados para evaluar tanto el cumplimiento del tratamiento como la detección precoz de la aparición de efectos adversos a la medicación. Si fuera posible, todos aquellos pacientes a quienes se les inicie tratamiento con drogas antiparasitarias, se les debe solicitar un hemograma, urea o creatinina, y enzimas hepáticas, alrededor de los 20 días de iniciado y una vez finalizado el mismo. En mujeres en edad fértil investigar la posibilidad de embarazo previo al inicio del tratamiento e indicar la anticoncepción durante el mismo. A todos los pacientes antes de iniciar el tratamiento se les debe dar las pautas de alarma, sobre todo la presencia de lesiones en piel y/o fiebre.

### ***Preguntas sin respuesta a 100 años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas***

A pesar de que la patología fue descrita por primera vez por Carlos Chagas hace más de 100 años<sup>24</sup>, el conocimiento de la enfermedad, su patogénesis y los factores relacionados a su progresión todavía es limitado. Probablemente, la enfermedad de Chagas es el resultado de una mezcla de interacciones complejas entre el parásito, la respuesta inmune del huésped y otros factores genéticos que todavía no han sido descritos en detalle.

### **Respuesta inmune anti-*Trypanosoma cruzi***

El control del *T. cruzi* depende de la respuesta inmune que se monta durante la fase temprana de la infección y es crítica para la supervivencia del huésped. Diferentes células y moléculas son capaces de combatir la diseminación del parásito; entre ellas las células mononucleares fagocíticas, las células natural killer (NK), anticuerpos y linfocitos B así como los linfocitos T citotóxicos y cooperadores.

Cabe destacar que más allá de su importancia epidemiológica y clínica, el estudio de la infección humana y experimental con *T. cruzi* ha aportado a un sustancial avance en el conocimiento sobre mecanismos gatillados por el sistema inmune del huésped contra el parásito. Así, aprovechando las características inherentes al modelo ha sido posible vislumbrar aspectos particulares de la respuesta intracardíaca; la participación de células y receptores de la inmunidad innata; la modulación de las diferentes poblaciones de linfocitos específicos tanto en la fase aguda como en la crónica y en respuesta a la terapia. Las complejas y fascinantes interacciones que se llevan a cabo para dar batalla a este microorganismo que ha evolucionado con el objetivo de persistir de por vida en el

hospedador no han sido completamente descubiertas. La oportunidad de investigar nuevos mecanismos aún no dilucidados será útil no sólo para el completo conocimiento de la interacción parásito-huésped sino para el futuro aprovechamiento terapéutico para ésta y otras patologías.

### ***Generalidades de Monocitos/Macrófagos***

Los monocitos y macrófagos son células mononucleares fagocíticas que presentan un rol crucial en la respuesta inmune. Recientemente se derribó un dogma de la inmunología que proponía que los macrófagos residentes de tejido provenían del constante reclutamiento de monocitos de sangre periférica<sup>25-27</sup>; es decir los monocitos y macrófagos eran considerados dos poblaciones celulares altamente relacionadas que provenían de una diferenciación continua. Sin embargo, a pesar de que los monocitos son capaces de dar origen a los macrófagos en ciertas condiciones particulares, recientes estudios describen que los macrófagos tisulares pueden derivar de precursores embrionarios que se mantendrían por auto-renovación/proliferación<sup>28-30</sup>.

### ***Monocitos***

Los monocitos representan en ratones el 4% y en humanos del 2-8% de los leucocitos circulantes en sangre periférica, con una reserva en bazo que es movilizada en base a la demanda celular<sup>31,32</sup>. En sangre los monocitos presentan una vida media corta de aproximadamente 20 horas y debido a su capacidad de dar origen tanto a macrófagos como a células dendríticas, se las define como un sistema celular altamente plástico y dinámico con capacidad de responder a la injuria.

Estas células expresan diferentes receptores capaces de reconocer tanto microorganismos, como lípidos y células muertas. Cuando se activan pueden producir grandes cantidades de moléculas efectoras como especies reactivas de oxígeno (ERO), prostaglandinas, óxido nítrico (NO), citoquinas como TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y enzimas proteolíticas involucradas en la defensa contra patógenos así como en la patogénesis de diferentes enfermedades inflamatorias como artritis y aterosclerosis<sup>33</sup>.

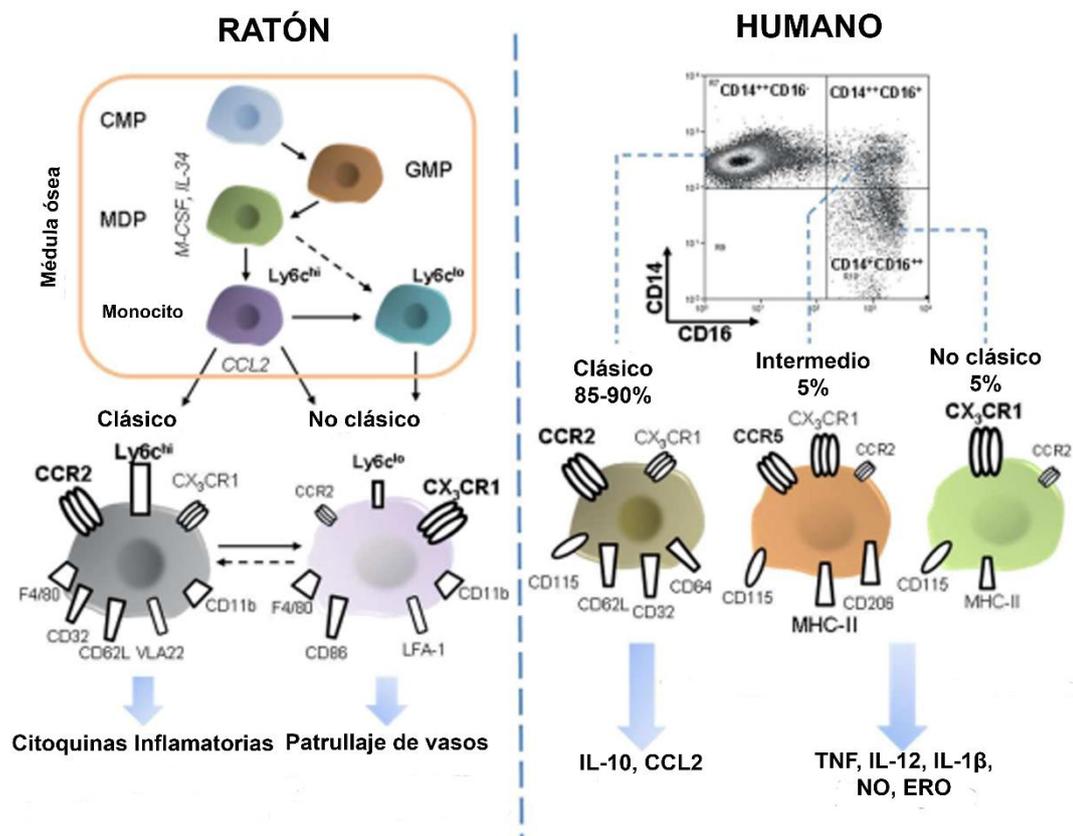
### ***Subpoblaciones de monocitos y sus funciones***

Inicialmente se identificaron dos subpoblaciones de monocitos humanos, una que expresa el receptor capaz de reconocer la porción Fc de IgG tipo III (CD16+) y otra que no lo hace (CD16-). Sin embargo, recientemente una nueva nomenclatura define tres poblaciones

de monocitos, donde la población minoritaria CD16<sup>+</sup> se divide en dos poblaciones más pequeñas. La población mayoritaria en condiciones homeostáticas -monocitos clásicos- (aproximadamente 85-90%) presenta alta expresión de CD14 (correceptor de lipopolisacárido), pero no expresa CD16 (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>). Los monocitos intermedios son CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> y los no clásicos son CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> y cada uno representa aproximadamente el 5% (Figura 3). A pesar de que la población de monocitos humanos ha sido exhaustivamente estudiada, aún no existe consenso acabado en cuanto a la funcionalidad de dichas subpoblaciones. Varios trabajos reportan a los monocitos CD16<sup>+</sup> (intermedios y no clásicos) como la principal fuente de TNF. Skrzecynska-Moncznik y colaboradores (2008) demostraron que la población de monocitos intermedios son los mayores productores de IL-10 en respuesta a LPS y zimosán (ligando de TLR2) <sup>34</sup>. Sin embargo, algunos trabajos recientes reportan que los monocitos clásicos son los que producen mayores niveles de IL-10 <sup>35</sup>.

La expansión de la población de monocitos intermedios y no clásicos ha sido descrita en diferentes patologías, principalmente en enfermedades infecciosas: bacterianas y virales, o inflamatorias: asma, periodontitis, entre otras. Sin embargo, todavía no queda claro cuál es la causa del incremento de esta población, y si llevan a cabo un rol protector o patogénico en las diferentes enfermedades.

En ratones las poblaciones de monocitos pueden diferenciarse en base a la intensidad de expresión del marcador Ly6C. Alta expresión de este marcador (Ly6C<sup>high</sup>/Ly6C<sup>++</sup>) identifica a los monocitos inflamatorios, que también expresan el receptor de quemoquinas CCR2 y migran desde médula ósea hacia el sitio de infección o inflamación <sup>36,37</sup>. Esta población da lugar a diferentes linajes celulares como células dendríticas, células de Langerhans en la piel, microglia en sistema nervioso central <sup>38,39</sup>. En contraste, los monocitos que presentan una baja expresión de Ly6C (Ly6C<sup>low</sup>/Ly6C<sup>+</sup>) son la principal población de monocitos circulantes en condiciones homeostáticas, presentan funciones de patrullaje y expresan el receptor de fractalkina CX<sub>3</sub>CR1 (Figura 3).



**Figura 3: Desarrollo y características de las subpoblaciones de monocitos murinos y humanos.**

Los monocitos se desarrollan desde un progenitor mieloide común (CMP) en médula ósea. El progenitor de células dendríticas y macrófagos (MDP) da origen a monocitos Ly6C<sup>high</sup> y probablemente también a monocitos Ly6C<sup>low</sup>. Los primeros presentan un perfil inflamatorio ya que secretan citoquinas inflamatorias, migran a tejido inflamado y dan origen a macrófagos M1 y células dendríticas. Los monocitos Ly6C<sup>low</sup> son menos abundantes en periferia y patrullan los vasos sanguíneos. Durante la inflamación entran rápidamente a los tejidos donde dan origen a macrófagos encargados de la reparación tisular. En humanos los monocitos son diferenciados en clásicos, intermedios y no clásicos, que a pesar de presentar nombres similares a los monocitos murinos, sus funciones son contrapuestas. Adaptado de Zimmermann *et al*, 2012.

### Macrófagos

Los macrófagos son células inmunes especializadas en la fagocitosis y neutralización de agentes potencialmente dañinos, incluyendo patógenos. Son células no migratorias que monitorean el microambiente local e inmediato a través de moléculas sensoras como receptores basureros o *scavengers*, receptores de reconocimiento de patrones (como TLR, NLR, entre otros), receptores de citoquinas y moléculas de adhesión. En respuesta a un estímulo, los macrófagos producen una batería de moléculas efectoras que depende del tejido donde residen. Así, juegan un rol crítico en orquestar la respuesta inmune produciendo citoquinas y quemoquinas que reclutan y activan otras células inmunes.

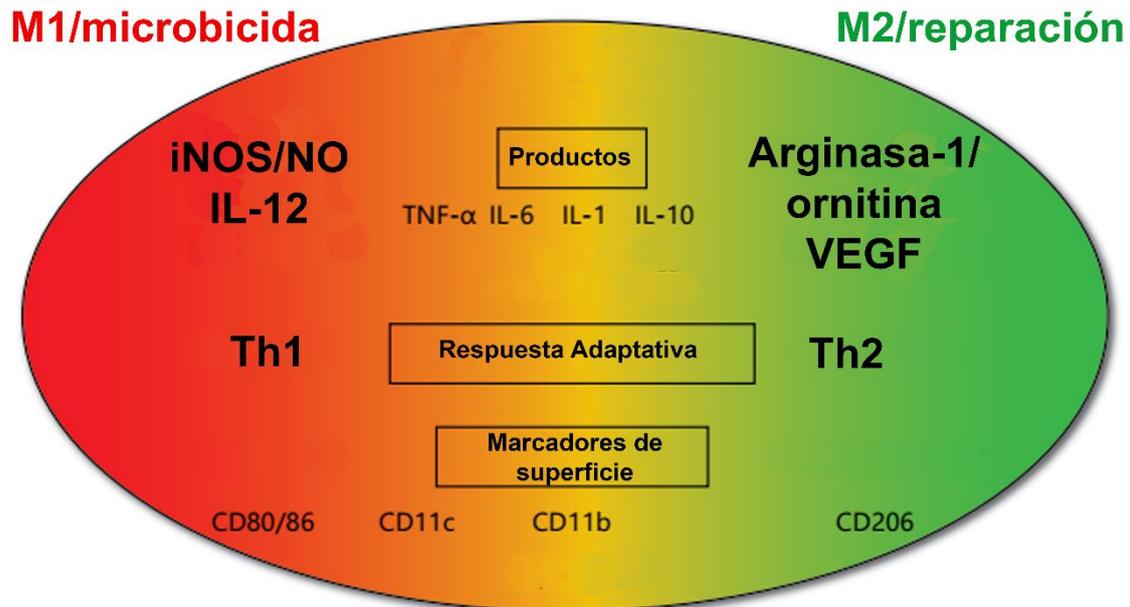
Son células altamente plásticas lo que les permite adaptarse a cambios en el microambiente y responder con diferentes y a veces contrapuestas funciones efectoras. La activación de los macrófagos se puede definir como una escala lineal continua donde los macrófagos M1/clásicos representan un extremo y los M2/alternativos representan otro.

Los macrófagos clásicos son aquellos activados por IFN- $\gamma$ , presentan una incrementada actividad microbicida o anti-tumoral y secretan gran cantidad de citoquinas y mediadores pro-inflamatorios. La fuente de IFN- $\gamma$  puede estar dada por células de la inmunidad innata (como células NK) o adaptativa (linfocitos T cooperadores tipo 1-Th1- o linfocitos T citotóxicos). Los macrófagos M1 llevan a cabo sus funciones microbicidas a través del NO producido por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) sobre la arginina. Sin embargo, los macrófagos M1 deben ser controlados para evitar el daño tisular excesivo ya que producen mediadores altamente inflamatorios (como IL-1 $\beta$ , TNF, IL-23, entre otros) potencialmente peligrosos. Con este objetivo, los macrófagos M2 frenan la inflamación y promueven la reparación/remodelación tisular y la angiogénesis <sup>40,41</sup> a través de la producción de citoquinas anti-inflamatorias y diferentes moléculas efectoras como VEGF, TGF- $\beta$ , entre otros. La activación alternativa representa un mecanismo de evasión de la respuesta inmune llevado a cabo por diferentes microorganismos intracelulares, ya que se producen metabolitos como urea y ornitina que favorecen el crecimiento del patógeno (Figura 4).

A pesar de los recientes avances en la definición de las diferentes poblaciones de macrófagos, todavía no está claro si la heterogeneidad funcional es el resultado de una diferenciación específica irreversible o es consecuencia de la inducción reversible y continua de diferentes programas funcionales.

#### ***Rol de los monocitos y macrófagos durante la infección con *Trypanosoma cruzi****

Los monocitos contribuyen a mantener la población de macrófagos en condiciones específicas, particularmente los monocitos Ly6C<sup>++</sup> son reclutados a tejidos inflamados y dan origen a macrófagos residentes de tejido. Una vez allí, los macrófagos derivados de monocitos responden a señales del medioambiente para contribuir a la respuesta inflamatoria local o a su resolución. Estas actividades opuestas se adquieren en respuesta a cambios dinámicos que ocurren a nivel tisular.



**Figura 4: Estados de activación de macrófagos.**

Los macrófagos llevan a cabo roles variados y pueden adaptarse a los estímulos del medioambiente desplegando un perfil M1 o M2, los cuales representan extremos de un espectro de fenotipos funcionales. Los macrófagos M1 son pro-inflamatorios y se activan clásicamente por citoquinas Th1 (IFN- $\gamma$ ). Además de servir como células presentadoras de antígeno, estos macrófagos muestran una incrementada capacidad microbicida atribuible a la producción de radicales libres (peróxido de hidrógeno, superóxido, ON y peroxinitritos) y citoquinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-12). En el otro extremo, los macrófagos M2 están alternativamente activados por citoquinas Th2 (IL-4, IL-13) o por mediadores anti-inflamatorios (IL-10), incrementando la expresión del receptor de manosa (CD206) en macrófagos M2a o del receptor de hemoglobina (CD163) en macrófagos M2c, por lo tanto promueven la reparación tisular y reducen la efectividad de la respuesta Th1.

Adaptado de Mills *et al*, 2014.

En particular, la interacción de *T. cruzi* con macrófagos y otras células de la inmunidad innata son mediadas por receptores de reconocimiento de patrones (RRP) como TLR. Luego del reconocimiento del patógeno, se activa el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), llevando a la producción de citoquinas inflamatorias y activando la respuesta inmune adaptativa. Las moléculas derivadas del parásito como los dominios de anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPIs) son reconocidas por TLR2 y estimulan la síntesis de IL-12 y TNF por los macrófagos<sup>42,43</sup>. Además, TLR4 y TLR9 también reconocen antígenos parasitarios y cooperan en la activación de la respuesta inmune innata del huésped para regular la infección<sup>44</sup>. El incremento de IL-12 inducido por *T. cruzi* media la producción de IFN- $\gamma$  a través de la activación de células NK y Th1. Este mediador activa a macrófagos a un perfil M1, induciendo iNOS y la posterior producción de NO<sup>44-46</sup> que media la muerte del parásito.

Además, otras células no inmunes pueden responder a la infección con *T. cruzi* produciendo citoquinas. Por ejemplo en las células endoteliales el parásito induce la

producción de IL-1 $\beta$  e IL-6<sup>47</sup>. Particularmente nuestro grupo reportó recientemente que la infección de cultivos primarios de cardiomiocitos induce selectivamente la producción de IL-6<sup>48</sup>, una citoquina pleiotrópica clave para la supervivencia de estas células blanco de la infección.

### ***El rol de los macrófagos en la injuria cardíaca***

Como en la mayoría de los tejidos, los macrófagos son las principales células inmunes que residen en corazón, ubicándose cerca de células endoteliales o dentro del espacio intersticial<sup>30,49,50</sup>. Cuando el tejido cardíaco sufre una injuria estéril o infecciosa, inicia una cascada celular dinámica que activa las células inmunes residentes y coordina el reclutamiento de diversas poblaciones de leucocitos al tejido inflamado.

En condiciones fisiológicas en tejido cardíaco predominan los macrófagos activados alternativamente. Sin embargo, luego de una injuria cardíaca los macrófagos M1 son rápidamente reclutados. El modelo más estudiado es el de infarto de miocardio, donde se proponen dos fases bien definidas. Primero predominan los macrófagos M1 pro-inflamatorios que se reclutan vía la quemoquina MCP-1/CCL2, y una segunda fase donde estas células son reemplazadas por macrófagos M2 que contribuyen a la resolución de la inflamación, pero inducen fibrosis cardíaca. Sin embargo, no ha sido estudiado aún el rol de los macrófagos cardíacos durante la infección con *T. cruzi*.

### ***Inmunidad Adaptativa: Células T CD8+ en respuesta a la infección***

A pesar de que la importancia de las células T CD8+ en el control de infecciones bacterianas y virales ha sido bien descrita, su rol en la detección y destrucción de patógenos como protozoarios intracelulares no ha sido exhaustivamente estudiado. Teniendo en cuenta que *T. cruzi* invade diferentes células incluyendo miocitos, adipocitos, células epiteliales, fibroblastos, macrófagos, entre otros, en su nicho citoplasmático libera proteínas que son procesadas y presentadas en contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo I activando células T CD8+. Así, las células T CD8 pueden controlar la infección a través de numerosos mecanismos, incluyendo actividad lítica vía perforina/granzima y producción de citoquinas (IL-2, TNF, IFN- $\gamma$ ).

En el contexto de la enfermedad de Chagas se reportó recientemente que la frecuencia de células T CD8 específicas fue menor en pacientes con cardiopatía en comparación con aquellos asintomáticos. Además, el estadio de diferenciación de estas células fue diferente. Aquellos que presentan patología cardíaca tienen menos células de memoria temprana y más de memoria tardía, sugiriendo que la protección frente a la patología se asocia con una

mayor frecuencia de células T CD8 específicas en estadios tempranos de diferenciación <sup>51</sup>. Concomitantemente, se describió un predominio de células CD8+ en infiltrado inflamatorio de tejido cardíaco de pacientes con cardiopatía <sup>52-54</sup>. Considerando esto, se propone que en modelos de infección experimental la cura terapéutica alcanzada por el tratamiento con Benznidazol induce un cambio desde el fenotipo de células T de memoria efectora hacia células T de memoria central <sup>55</sup>. Por lo tanto, la severidad de la patología se podría relacionar con la especificidad y la calidad de la respuesta T citotóxica durante la infección.

### **IL-6: Una citoquina con múltiples funciones**

Las citoquinas juegan un papel importante en la comunicación intercelular, actuando sobre diferentes células blanco regulan su supervivencia, crecimiento, diferenciación y funciones efectoras. Además, también modulan la respuesta inmune durante procesos inflamatorios estériles o infecciosos, y en enfermedades autoinmunes. Ejercen sus acciones, que pueden ser auto- o paracrinas, a través de receptores específicos. A diferencia de las hormonas, las citoquinas no se encuentran preformadas almacenadas en una glándula, sino que luego de la correcta estimulación, las células son capaces de gatillar una rápida síntesis para luego secretarlas <sup>56</sup>.

Desde que fue clonado el gen que codifica para IL-6 en 1986, una variedad de funciones, a veces contradictorias, han sido asociadas a esta citoquina, como la protección frente a infecciones y la promoción de enfermedades inflamatorias. A lo largo de muchos años se le asignó un rol clave como miembro del trio de citoquinas (junto a TNF e IL-1 $\beta$ ) que dirige la respuesta inflamatoria aguda. Sin embargo, más recientemente se describió cómo la disregulación en la señalización de IL-6 contribuye a condiciones inflamatorias en patologías como obesidad e insulinoresistencia <sup>57</sup>.

Diferentes tipos celulares producen IL-6, entre ellos la principal fuente son monocitos y macrófagos en sitios de inflamación aguda y células T en inflamación crónica. En condiciones homeostáticas, los niveles de IL-6 son bajos, e incrementan en situaciones de estrés.

#### ***Propiedades pro- y anti-inflamatorias de IL-6 en la respuesta inmune innata***

La literatura de los últimos 30 años ha reportado el efecto de IL-6 en fagocitos mononucleares, sistema de complemento y RRP. Sin embargo, el rol fundamental de esta citoquina en la inmunidad innata queda claro con la identificación de una familia IL-6-like en *Drosophila melanogaster*. Se describió que en este sistema tiene un papel clave en el control

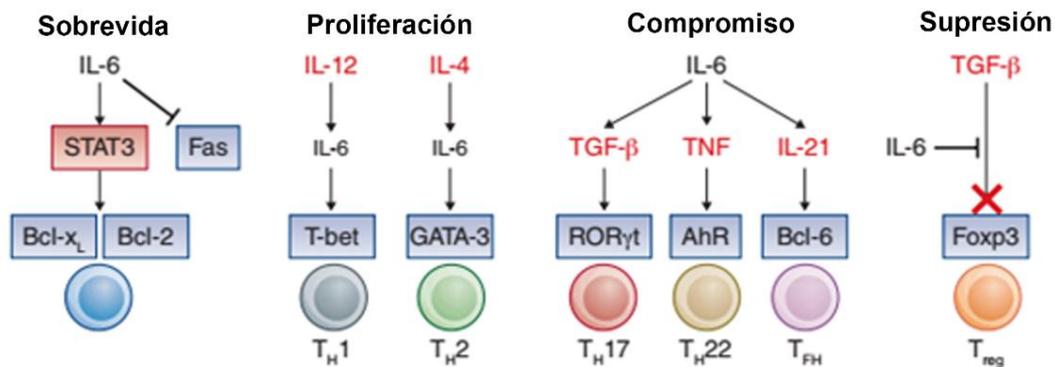
de la glucosa y homeostasis tisular. No obstante, el mayor avance en la descripción de las funciones de IL-6 en la respuesta inmune innata se llevó a cabo en modelos de infección viral y en la susceptibilidad a endotoxemia <sup>58-60</sup>.

Ha sido extensamente estudiado como IL-6 modula diversos aspectos del sistema inmune innato, incluyendo la hematopoyesis y la acumulación de neutrófilos en sitios de infección o trauma. Este efecto puede ser atribuido a que IL-6 promueve la secreción de las quemoquinas CXCL5, CXCL6, MCP-1/CCL2 y CCL8, induce la expresión del receptor de *homing* a nódulo linfático CD62L, y modula la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 {Modur, 1997 #2717; McLoughlin, 2004 #2718; Chen, 2004 #2719; Romano, 1997 #2720; Matsumiya, 2001 #2721}. *In vitro* IL-6 promueve la maduración de macrófagos al controlar la expresión del receptor del factor estimulante de colonia de macrófagos <sup>61</sup>. Además, IL-6 inhibe la activación del factor NF-κB e induce la expresión del receptor antagonista de IL-1 y el receptor soluble p55 de TNF <sup>62,63</sup>. Estos resultados son consistentes con la habilidad de IL-6 de promover la activación alternativa de macrófagos descrita previamente en modelos de injuria estéril <sup>57</sup> y su capacidad para inhibir la actividad microbicida y producción de citoquinas pro-inflamatorias <sup>64,65</sup>. Por lo tanto, si bien IL-6 presenta claros efectos pro-inflamatorios, es necesario tener en cuenta que la actividad de IL-6 depende del contexto, y que esta citoquina es capaz de coordinar actividades anti-inflamatorias esenciales para la resolución de la inflamación.

#### ***IL-6 modula la inmunidad adaptativa***

En un principio IL-6 fue identificada como una linfoquina capaz de inducir la maduración de células B a células productoras de anticuerpos, promoviendo la supervivencia de células plasmáticas de larga vida. Además, la habilidad de IL-6 de promover la inmunidad humoral ha sido relacionada a los efectos de esta citoquina sobre las células T cooperadoras foliculares (TFH), un subtipo especializado de células T CD4 que se localiza en folículos de células B promoviendo la proliferación y el cambio en el isotipo de inmunoglobulinas <sup>66</sup>.

Se demostró también que IL-6 es capaz de inducir el perfil de células T CD4 Th17. Teniendo en cuenta el rol patogénico descrito para esta población celular, el tratamiento con bloqueantes de IL-6 ha tomado notoriedad en ciertas patologías. Sin embargo, es necesario tener presente que IL-6 es capaz de inducir en células T la producción de IL-10<sup>67,68</sup> (Figura 5).



**Figura 5: Actividad pleiotrópica de IL-6 en células de inmunidad adaptativa.**

IL-6 dirige la proliferación y supervivencia de células Th1 y Th2 y es crítica para el compromiso de poblaciones efectoras específicas como Th17, Th22 y TFH. Además, inhibe el desarrollo de células Treg. Adaptado de Hunter *et al*, 2016.

### **Obstáculos en el tratamiento con bloqueantes de IL-6**

A los fines de hacer más eficientes las terapias que inhiben la vía de señalización de IL-6, es importante comprender porque en ciertas situaciones clínicas el bloqueo de dicha citoquina no es efectivo y cómo diferentes estrategias de intervención pueden llevar a beneficios únicos sólo en subgrupos definidos de pacientes. La eficacia del inhibidor de IL-6 fue evaluada en un principio en mieloma múltiple donde se observó que suprime la respuesta de fase aguda, pero incrementa los niveles sistémicos de IL-6<sup>69</sup>, por lo que se desarrollaron inhibidores del receptor de dicha citoquina.

En diferentes patologías se ha observado que el bloqueo de IL-6 lleva a indeseables efectos colaterales como aumento de amiloide A (equivalente en ratón a la proteína C reactiva de humanos), neutropenia, aumento de transaminasas hepáticas y alteración en la composición de lípidos.

La mayoría de las enfermedades en las cuales la inhibición de IL-6 presenta beneficios clínicos están frecuentemente asociadas a una desregulación en la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, incluso en patologías como artritis reumatoidea, donde el bloqueo de IL-6 es una terapia efectiva, algunos pacientes presentan falla terapéutica. Teniendo estos

datos en cuenta, es necesario comprender el rol de IL-6 en las diferentes patologías para poder estratificar mecanismos de intervención adecuados.

### ***Rol de IL-6 en la respuesta inmune cardíaca***

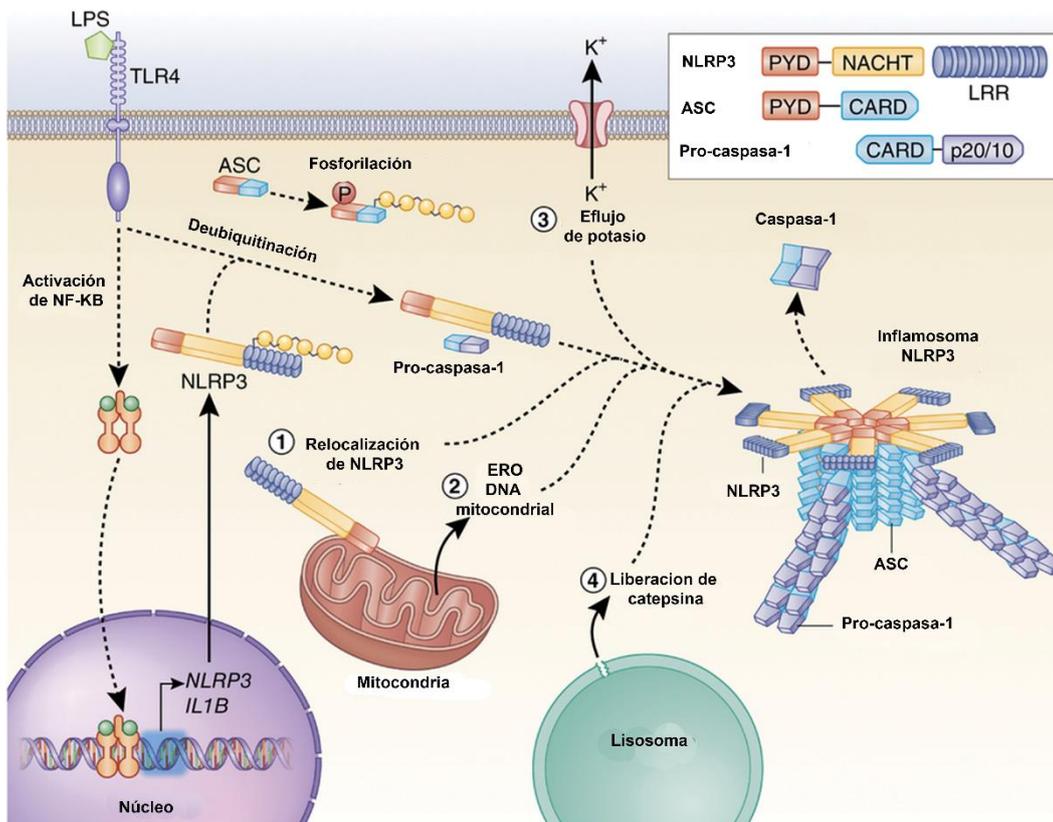
En respuesta a diferentes injurias cardíacas, IL-6 es producida rápida y continuamente por cardiomiocitos y células vecinas sugiriendo que esta citoquina es una parte fundamental del sistema intrínseco de respuesta al estrés cardíaco. Se ha reportado que la IL-6 incrementa en infarto de miocardio y en pacientes con falla congestiva crónica y con cardiomiopatía hipertrófica<sup>70-72</sup>.

A pesar de que los niveles séricos de IL-6 se encuentran incrementados en individuos que presentan diversas patologías cardíacas, este aumento se ha asociado a una respuesta inducida con el objetivo de mantener la homeostasis. Lo que sugeriría que esta citoquina lleva a cabo un rol importante en orquestar la respuesta inmune innata durante una injuria cardíaca, previniendo consecuencias catastróficas que la inflamación descontrolada tendría en este tejido vital.

IL-6 tiene un importante papel participando en la inhibición de la apoptosis y en la hipertrofia de cardiomiocitos<sup>48,73-76</sup>. Sin embargo, otras citoquinas pro-inflamatorias que no pertenecen a este grupo también parecen tener un rol central en la coordinación de la respuesta cardíaca intrínseca durante una situación de estrés, proporcionando señales temporales citoprotectoras anti-apoptóticas que permiten la reparación y/o remodelación tisular. En el contexto de la infección por *T. cruzi*, se detectaron altos niveles de IL-6 en el suero y tejidos durante la infección murina con este parásito cardiotrópico<sup>77</sup>. Recientemente, nuestro grupo reportó por primera vez que la actividad cisteín proteasa del parásito puede dirigir la respuesta celular inducida por IL-6 por medio del clivaje de su receptor (gp130)<sup>73</sup>. En línea con esto, nuestro grupo y otros observaron que ratones IL6KO rápidamente sucumben a la infección con *T. cruzi*<sup>78,79</sup>. Estos resultados sugieren que IL-6 tiene un rol determinante para la supervivencia del huésped modulando la respuesta inmune innata durante la infección. Sin embargo, aunque se ha evidenciado la importancia de IL-6 en la respuesta inmune anti-parasitaria, poco se conoce acerca de los efectos de esta citoquina sobre las células inmunes innatas durante la infección.

## Inflamosoma e IL-1 $\beta$

El inflamosoma es un complejo multiproteico a través del cual se gatilla la principal vía pro-inflamatoria del sistema inmune innato. Su activación requiere de una primera señal de reconocimiento a través de receptores TLR que lleva a la producción de pro-IL-1 $\beta$ . Seguidamente los receptores tipo NOD (NLR) se acoplan con la molécula adaptadora ASC y pro-caspasa-1, convirtiéndola a su forma activa caspasa-1 que cliva el precursor de IL-1 $\beta$  e IL-18. La liberación de ambas citoquinas activa una cascada inflamatoria en el huésped (Figura 6).



**Figura 6: Mecanismo de activación del inflamosoma NLRP3.**

NLRP3 necesita una señal de priming que involucra estímulos que activen NF-κB como la unión de LPS a TLR4, induciendo un incremento en la expresión de NLRP3. La molécula adaptadora ASC se ubiquitina y fosforila para facilitar el ensamblaje del inflamosoma. Luego se activa NLRP3 por diferentes mecanismos como ERO o ADN mitocondrial, eflujo de potasio o liberación de catepsina por desestabilización de la membrana lisosomal. Adaptado de Haitao Guo *et al*, 2015.

El inflamosoma NLRP3 es el más estudiado ya que presenta mayor relevancia clínica. Productos derivados de patógenos, moléculas estériles y estímulos endógenos como ATP

son capaces de activar el inflamosoma. Algunos de los mecanismos involucrados en la activación incluyen el eflujo de potasio, la generación de ERO, entre otros.

El rol protector que presenta la activación del inflamosoma en la respuesta anti-*Trypanosoma cruzi* en la infección experimental ha sido estudiado recientemente. Silva y colaboradores proponen que la salida de parásitos del fagosoma de macrófagos a amastigotes citosólicos libera patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que disparan el ensamble del inflamosoma. Los autores demostraron que la activación de genes relacionados al inflamosoma en tejido de animales infectados con *T. cruzi* ejerce un rol en la respuesta anti-parasitaria. En esa línea, macrófagos deficientes en NLRP3 presentan menor actividad anti-*T. cruzi* probablemente por la disminución en la capacidad de producir NO.

#### ***ATP: el activador más común de NLRP3***

Ha sido ampliamente descrito el rol pro-inflamatorio de ATP, que actúa como señal de daño celular activando el inflamosoma en células mononucleares fagocíticas. Además, esta molécula versátil lleva a cabo importantes funciones en la comunicación célula-célula y regula procesos fisiológicos o patológicos en diferentes órganos y tejidos.

La concentración extracelular de ATP está controlada por una familia de ectoenzimas que continuamente degrada ATP, frenando la inflamación. CD39 (ectonucleosido trifosfato difosfohidrolasa 1 -ENTPD1-) convierte ATP en ADP y posteriormente AMP, y luego CD73 (ecto-5` nucleotidasa -Ecto5NT-) defosforila AMP a adenosina (ADO). Estas dos ectoenzimas son importantes para regular la duración, magnitud y composición de la activación de la vía purinérgica y tendrían un fuerte impacto en la modulación de la respuesta inmune. La actividad y expresión de ambas llevan a cabo cambios dinámicos de acuerdo con el contexto patofisiológico <sup>80</sup>.

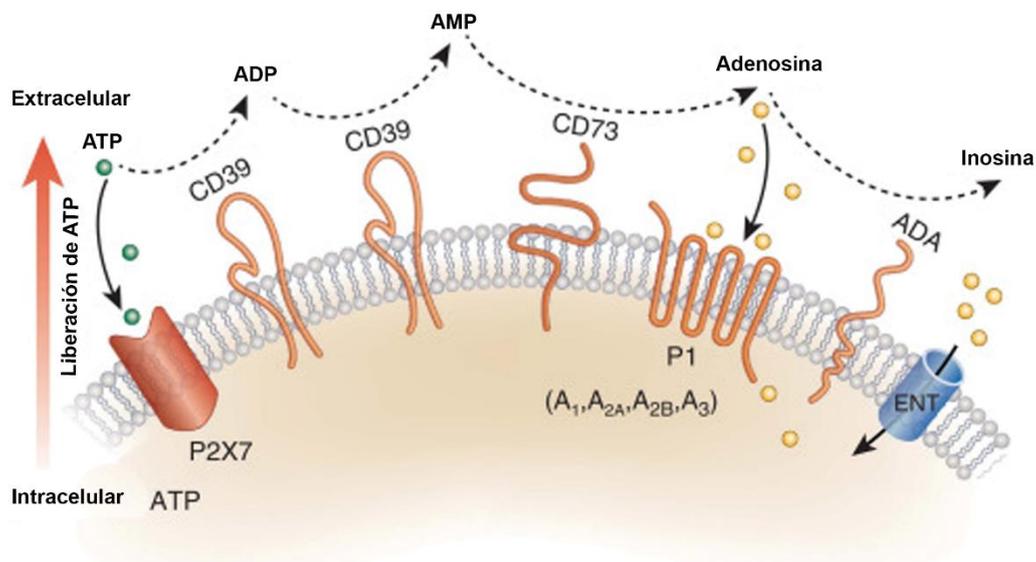
#### ***Rol patofisiológico de las enzimas encargadas de degradar ATP***

La expresión de CD39 es regulada por diferentes citoquinas, estrés oxidativo e hipoxia <sup>81-83</sup> a través de factores de transcripción como SP1 y STAT3. Además, se reportó el incremento de la expresión de CD39 en tumores sólidos (cáncer colorectal, de cabeza y cuello, pancreático), así como en leucemia linfocítica crónica, sugiriendo que esta enzima está involucrada en el desarrollo y progresión de estas enfermedades <sup>83</sup>.

CD73 se encuentra en una amplia variedad de tejidos, e incrementa en condiciones de hipoxia <sup>84,85</sup> y en presencia de mediadores pro-inflamatorios como TNF e IL-1 $\beta$  <sup>86,87</sup>.

Teniendo en cuenta que la acción sucesiva de las enzimas CD39 y CD73 degradan ATP dando como producto final ADO, estas proteínas son capaces de cambiar el medioambiente de un estado pro-inflamatorio a uno anti-inflamatorio por la presencia de ADO (Figura 7).

Particularmente la diferenciación y actividad de macrófagos puede ser regulada por medio de la concentración de purinas. La ausencia de CD39 y CD73 lleva a la acumulación de ATP induciendo en macrófagos peritoneales la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF<sup>88,89</sup>. En línea con estos estudios, recientemente nuestro grupo reportó que la inhibición transitoria de CD73 modula el perfil de macrófagos en tejido cardíaco murino infectado, mejorando la progresión de la patología cardíaca crónica<sup>90</sup>. Teniendo en cuenta estos resultados, la evaluación de la expresión de estas ectoenzimas y los mecanismos que la regulan podría tener un potencial uso terapéutico lo que amerita su estudio exhaustivo en diferentes modelos.



**Figura 7: Mecanismo de degradación de ATP.**

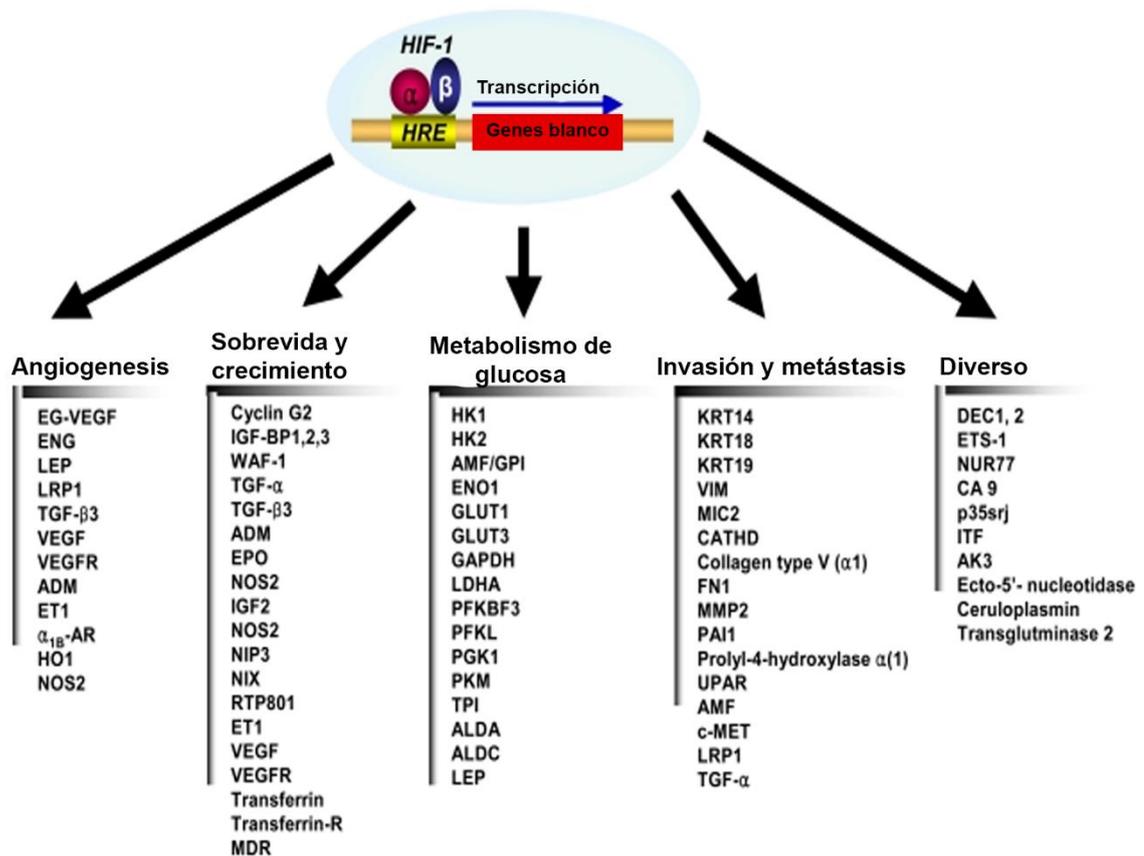
Ectoenzimas encargadas de degradar ATP a ADP y AMP (CD39) y posteriormente a adenosina (CD73) expresadas en la superficie de diferentes poblaciones celulares. Adaptado de Veena S. Roberts et al, 2014.

Ha sido reportado que ambas ectoenzimas incrementan su expresión en respuesta a la hipoxia con el objetivo de frenar el excesivo daño colateral a la sobre-activación de células inmunes en el tejido inflamado. Es de vital importancia conocer como la baja tensión de oxígeno conlleva a cambios bioquímicos en las células inmunes modulando la homeostasis de dichas células y su posterior respuesta frente a patógenos. Una de las señales generadas por hipoxia la provee el mediador HIF (factor inducible por hipoxia) que incrementa la

expresión de genes que permiten una mejor distribución de oxígeno y mejoran la supervivencia de la célula hospedadora.

HIF-1 es un factor de transcripción heterodimérico, cuya expresión es regulada por los niveles de oxígeno, estrés oxidativo y citoquinas inflamatorias. La estabilidad de la subunidad  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) es regulada por la familia de hidrolasas dependientes de oxígeno. En condiciones de hipoxia, esta actividad hidrolasa se inhibe e HIF-1 $\alpha$  se acumula y trasloca al núcleo, donde se une a HIF-1 $\beta$  (expresado constitutivamente). HIF-1 $\alpha$  presenta una variedad de genes blanco que incluyen factores angiogénicos, enzimas glucolíticas, transportadores de glucosa, eritropoyetina, entre otros <sup>91</sup>.

Estudios previos realizados en ratones con niveles modificados de HIF-1 $\alpha$  revelan el rol clave de dicho factor en la actividad bactericida de los fagocitos. Macrófagos de ratones deficientes en HIF-1 $\alpha$  muestran una disminuida capacidad de matar a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas comparado con macrófagos provenientes de animales salvajes. Mientras que la delección de HIF-1 $\alpha$  no altera la producción de ERO por los fagocitos, la expresión de un gran número de efectores moleculares involucrados en la defensa innata del huésped se correlacionan con los niveles de dicho factor de hipoxia. Entre estos factores se encuentran péptidos antimicrobianos, catepsina G, TNF y NO (Figura 8). Además de sus actividades microbicidas, el NO estabiliza HIF-1 $\alpha$  redistribuyendo el oxígeno intracelular e inhibiendo la actividad de hidrolasas, por lo que este podría ser un mecanismo de amplificación de activación de células mieloides <sup>92</sup>.



**Figura 8: Genes inducidos por HIF.**

Genes asociados a angiogénesis, supervivencia, metabolismo de glucosa inducidos por el factor HIF-1 $\alpha$ . Adaptado de Soon-Sun Hong *et al*, 2004.

### ***Óxido nítrico y estrés oxidativo***

Las ERO y las especies reactivas de nitrógeno (ERN) son producidas por todas las células eucariotas. Estas moléculas regulan diversos procesos fisiológicos incluyendo la proliferación, migración, hipertrofia, diferenciación y metabolismo, pero en exceso reaccionan con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos alterando las propiedades estructurales y funcionales de las moléculas blanco y llevando a un extenso daño tisular y posterior disfunción. El rol de estas especies oxidantes está tomando importancia en el desarrollo de diferentes patologías cardiovasculares, incluyendo aterosclerosis y complicaciones renales de la diabetes mellitus. El estrés oxidativo se define como un desbalance donde la producción de especies oxidantes supera la capacidad anti-oxidante del sistema biológico. A pesar de que numerosos reportes indican una relación estrés oxidativo-disfunción cardiovascular en modelos animales, no existen estudios concluyentes del rol de estas moléculas en la patogénesis de dichas patologías en humanos.

El NO es una de las principales ERN. Aunque inicialmente fue descrito como molécula efectora de los macrófagos, numerosos estudios le asignan un rol de mensajero que regula la respuesta inmune y la dilatación de vasos sanguíneos. Considerando que el NO es tan lábil, la medición directa es sumamente dificultosa, por lo que se empezaron a estudiar las enzimas que lo producen. Existen al menos 3 isoformas diferentes: NOS1, NOS2 y NOS3. Cada una de ellas sintetiza NO bajo diferentes condiciones, aunque frecuentemente, se pueden encontrar las 3 isoformas en una misma célula.

- NOS1: es la isoforma cerebral, también conocida como bNOS. Colabora en la transmisión sináptica, el procesamiento de la información entre nervios, y entre nervios periféricos y el cerebro.

- NOS2: también llamada iNOS. Esta enzima genera cantidades extraordinariamente altas de NO para llevar a cabo funciones microbicidas. Esta enzima se induce bajo condiciones específicas (hipoxia, infecciones).

- NOS3: también llamada eNOS (derivada de células endoteliales). Esta isoforma está activa constitutivamente y mantiene el diámetro de los vasos sanguíneos para mantener la perfusión tisular a niveles óptimos.

Aunque las células pueden producir ERO mediante diferentes mecanismos, la primera fuente de producción en fagocitos es a través del complejo NADPH oxidasa, que cataliza la reducción del oxígeno a anión superóxido utilizando electrones suministrados por NADPH. La oxidasa es una enzima de múltiples componentes que consta de dos proteínas de membrana y al menos cuatro componentes citosólicos<sup>93,94,95</sup>. Cuando NADPH se activa, sus componentes citosólicos se ensamblan a la membrana celular generando ERO.

La reacción del anión superóxido con NO genera peroxinitrito, una de las moléculas más oxidantes del organismo capaz de reaccionar con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. En este sentido, elevados niveles de peroxinitritos correlacionan con la progresión tumoral en varios tipos de cáncer, un efecto que se asocia con células T no respondedoras<sup>96</sup>.

### ***Daño oxidativo en proteínas***

El incremento de la biodisponibilidad de ERO/ERN pueden llevar a la oxidación o nitración de proteínas, presentando consecuencias como pérdida o ganancia de función/actividad enzimática, alterada interacción proteína-proteína, cambios conformacionales, cambios en la localización, susceptibilidad a proteólisis, incrementada inmunogenicidad y modificación de la transcripción de genes. Estas modificaciones bioquímicas alteran la señalización y la función celular. Uno de los principales blancos de la

actividad de peroxinitritos son tirosina y triptófano, generando 3-nitrotirosina y nitrotriptófano, modificaciones que afectan tanto la estructura como la función proteica.

### ***Daño oxidativo en lípidos***

Debido a su alta reactividad las ERO y ERN son incapaces de difundir fuera de sus sitios de formación, llevando a alteraciones locales. Por lo que se propone que los productos de peroxidación lipídica amplifican y propagan los efectos de las especies oxidantes <sup>97,98</sup>.

### ***Consecuencias del estrés oxidativo***

Los peroxinitritos son capaces de dirigir diferentes mecanismos moleculares que impactarán en la respuesta inmune en diversas poblaciones celulares. Particularmente en células T, a través de contacto celular directo, induce pérdida de la expresión de la cadena  $\zeta$  del TCR <sup>99</sup>, interfiere con la señalización de IL-2 <sup>100</sup>, lo que lleva a la desensibilización de la activación de las células T, y posteriormente a la pérdida de sus funciones. Es importante destacar que la principal población celular afectada por la toxicidad de los peroxinitritos son las células CD8+, ya que la molécula CD8 por su estructura protéica extracelular es más sensible de sufrir nitración en sus residuos aminoácidos, generando células T no respondedoras a estímulos antigénicos específicos <sup>101</sup>.

### ***Estrés oxidativo y respuesta anti-*T. cruzi****

Durante la infección los trypomastigotes invaden macrófagos y sobreviven a las condiciones oxidativas en el interior del fagosoma. El anión superóxido es convertido adentro del fagosoma a efectores tóxicos como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, una molécula sin carga que puede difundir a través de la membrana plasmática y oxidar lípidos y proteínas. Es importante destacar que numerosos estudios demuestran que al inhibir la generación de especies reactivas se incrementa la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*, sugiriendo que el estado redox juega un rol clave en la activación de la respuesta inmune y en el control del crecimiento parasitario.

Sin embargo, a pesar de ser un factor necesario en la respuesta anti-*T. cruzi*, las sustancias pro-oxidantes también afectan la función cardíaca crónica durante la patología chagásica. Estudios en modelos experimentales y en humanos demuestran que los huéspedes sufren estrés oxidativo <sup>102</sup>. Trabajos previos en modelos animales infectados revelan un incremento en la producción de ERO en tejido cardíaco y posterior incremento de productos de oxidación proteica y lipídica <sup>103</sup>. Como es de esperar, al prevenir la injuria oxidativa durante el estadio crónico la función cardíaca mejora <sup>104</sup>. Todas estas

observaciones en conjunto permiten concluir que el estrés oxidativo sostenido presenta una importancia patológica en la progresión de la cardiomiopatía chagásica.

### **Síndrome Metabólico**

El síndrome metabólico se define como un conjunto de disturbios que incluyen intolerancia a la glucosa, obesidad central, dislipemia (hipertrigliceridemia, disminución de HDL, entre otros) e hipertensión. Su incidencia en la población general es alta y va en incremento. Se puede presentar de diversas formas, de acuerdo a la combinación de los diferentes componentes previamente nombrados, que incrementan el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, diabetes tipo 2 y cáncer <sup>105-107</sup>. Sin embargo, no está establecido cómo comienza y cuáles son los diferentes eventos que tienen un rol en el desarrollo y progresión de estos desórdenes. Por ejemplo la Asociación Americana de Endocrinología no considera a la obesidad como un componente del síndrome metabólico, mientras destaca la importancia de la insulinoresistencia <sup>108</sup>. La definición inicial de la OMS considera a la insulinoresistencia como una característica necesaria del síndrome metabólico <sup>109-111</sup>, mientras que el programa de educación nacional de colesterol (NECP) le da igual importancia a la intolerancia a la glucosa, obesidad, hipertensión y dislipemia <sup>112</sup>.

La inflamación en general, es una respuesta fisiológica de un organismo a un estímulo peligroso (físico, químico o biológico) con el objetivo de re-establecer la homeostasis. El estado inflamatorio que acompaña al síndrome metabólico presenta un balance energético positivo que demanda al tejido adiposo que sea plástico e incluye la formación de nuevos adipocitos y cambios del espacio anatómico para la expansión del tejido adiposo <sup>113</sup>.

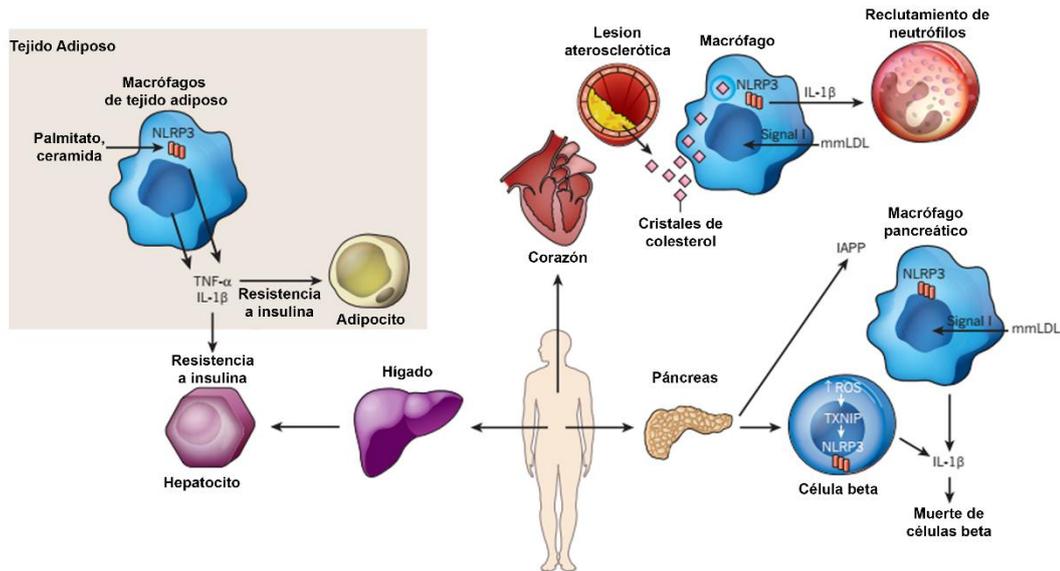
Un evento importante que se asocia con el síndrome metabólico está dado por un incremento en la concentración de ácidos grasos no esterificados (NEFA) circulantes, lo que refleja la inhabilidad del tejido adiposo para captar el exceso de nutrientes y genera un estado de dislipemia. Por la carga de ácidos grasos, el hígado incrementa la producción apo-B que transporta triacilglicérols al tejido adiposo resultando en la formación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) <sup>114</sup>. Además, otros tejidos como el hígado, páncreas y corazón son usados para acumular lípidos <sup>115</sup>, a pesar de que esto presenta un riesgo para sus funciones. La lipotoxicidad resulta en el caso de músculo, hígado y páncreas, en insulinoresistencia.

A pesar de que hace tiempo se consideran los adipocitos involucrados en la respuesta inmune innata, recientemente fue descrita en ellos la expresión de TLR2 y TLR4. Estos receptores son activados por lípidos específicos y llevan a la producción de factores pro-inflamatorios, lo que contribuye a agravar el síndrome metabólico. Numerosos reportes muestran que la exposición de los adipocitos a diferentes sustancias estresantes (estrés oxidativo, citoquinas inflamatorias y ácidos grasos) lleva a la activación de kinasas y la posterior insensibilidad a la insulina.

El tejido adiposo puede ubicarse visceral o subcutáneo. El tejido adiposo visceral (TAV) es altamente activo metabólicamente hablando y está asociado a una incrementada producción de TNF. Los adipocitos más grandes son más susceptibles a la ruptura y constituyen un foco de inflamación. Los macrófagos forman coronas rodeando adipocitos muertos; sin embargo la composición de macrófagos es dinámica y se modifica con el flujo de lípidos. Teniendo en cuenta que el número y el estado metabólico de los macrófagos ocurren simultáneamente con los cambios en la sensibilidad a la insulina <sup>116,117</sup>, estas células coordinan la respuesta inflamatoria que incluye la acumulación de células CD8+, CD4+ Th1 y pérdida de células T regulatorias (Treg) <sup>118</sup>. El fenotipo de estas células modula la resistencia a insulina asociada a inflamación. Los macrófagos M2 son inmunoregulatorios y mantienen la sensibilidad a la insulina en tejido adiposo e hígado, mientras que los macrófagos M1 interrumpen la sensibilidad a la insulina en dichos tejidos.

Brevemente, el metabolismo de macrófagos M1 está caracterizado por incrementada glucólisis y presenta un ciclo de ácidos tricarboxílicos truncado, llevando a la acumulación de succinato y citrato. La acumulación de succinato estabiliza al factor HIF-1 $\alpha$  mediante diferentes mecanismos directos (inhibición de prolil-hidroxilasas) o indirectos (generación de ERO)<sup>119</sup>, induciendo la producción de IL-1 $\beta$  <sup>120</sup> y un incremento en el influjo de glucosa, característico de los macrófagos M1.

El metabolismo de glucosa en células inmunes es controlado principalmente por cambios en la expresión del transportador de glucosa 1 (Glut1). Además, se demostró que el estrés oxidativo induce la expresión de Glut1 <sup>121</sup>, indicando que ERO y ERN pueden servir como una señal fisiológica para inducir el metabolismo de glucosa. Concomitantemente, altos niveles de glucosa inducen estrés oxidativo en una amplia variedad de células, incluyendo los monocitos. Generando de esta manera un mecanismo de retroalimentación positiva. Adicionalmente, las células que presentan gran captación de glucosa incrementan la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF e IL-1 $\beta$  (Figura 9).



**Figura 9: El rol del inflamósoma NLRP3 en síndrome metabólico.**

El inflamósoma NLRP3 es activado por diferentes DAMPs en múltiples tejidos y tipos celulares resultando en un estado pro-inflamatorio que lleva a deteriorar las funciones metabólicas. En tejido adiposo, palmitato y ceramida activan NLRP3 en macrófagos infiltrantes llevando a un estado de resistencia a insulina. En el páncreas, la generación de ERO mitocondrial activa NLRP3 en macrófagos y células  $\beta$ . El incremento de IL-1 $\beta$  en islotes pancreáticos resulta en muerte de la célula  $\beta$  y consecuente disminución de la producción de insulina. Los cristales de colesterol activan el inflamósoma en macrófagos promoviendo un incremento en el infiltrado inflamatorio e induciendo la progresión a aterosclerosis.

Por otro lado, el perfil metabólico de macrófagos M2 está definido por fosforilación oxidativa (OXPHOS),  $\beta$  oxidación de ácidos grasos y disminuída glucólisis<sup>119</sup>. Se propone que el cambio glucolítico en macrófagos M1 facilita la respuesta óptima para una activación rápida necesaria en los sitios de infección/inflamación<sup>122</sup> mientras que los macrófagos M2 producen ATP de forma más eficiente necesaria para situaciones de alta demanda energética o para mantener una longevidad por un largo período de tiempo<sup>123</sup>.

El creciente interés en comprender el inmunometabolismo radica en que representa una nueva oportunidad terapéutica para tratar enfermedades inflamatorias y cáncer. En particular, la re-polarización metabólica de macrófagos tendría un rol clave en la batalla contra diferentes patologías como obesidad y aterosclerosis.

## Capítulo II:

IL-6 promueve la polarización alternativa de macrófagos modulando la degradación de ATP y controla los efectos letales del estrés oxidativo en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*

Considerando los antecedentes antes descritos y las observaciones previas realizadas por nuestro grupo y por otros que demuestran que los animales deficientes en IL-6 rápidamente sucumben a la infección con *Trypanosoma cruzi*, en el presente trabajo de tesis nos planteamos determinar cuáles son los mecanismos protectores celulares y moleculares que gatillados por IL-6 permiten al huésped infectado mantener su sobrevivencia. Los resultados permitirán comprender por qué el bloqueo de dicha molécula en el tratamiento de ciertas patologías con compromiso inmune, puede llevar al desarrollo de numerosos efectos adversos, o incluso a la falla terapéutica.

### **Objetivos**

**General:** Dilucidar los mecanismos gatillados por la respuesta inmune innata cardíaca frente a la infección con *Trypanosoma cruzi* y establecer la participación de IL-6 en dichos mecanismos.

#### **Específicos:**

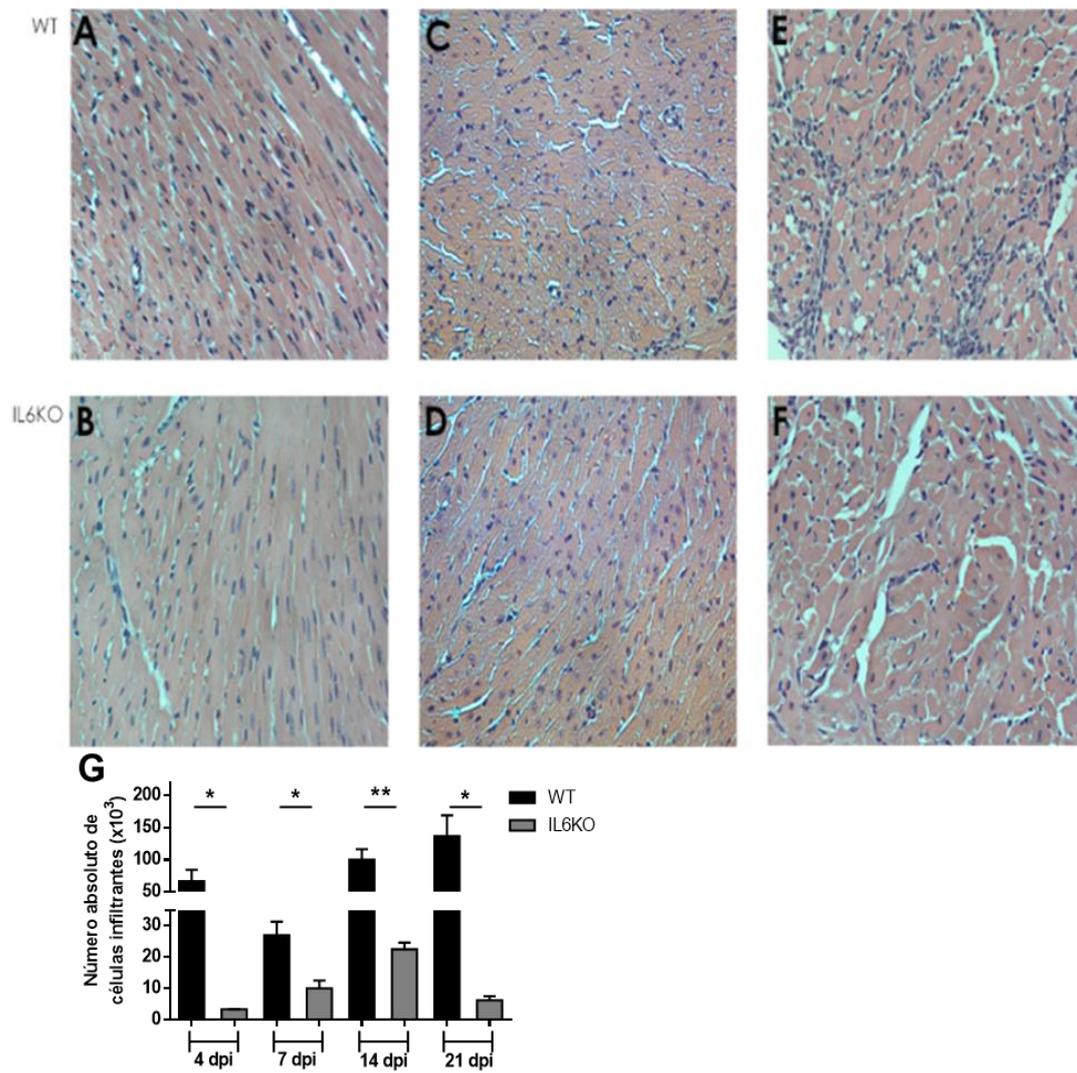
1. Determinar el papel de IL-6 en el reclutamiento de células inmunes a miocardio infectado.
2. Evaluar el perfil de macrófagos infiltrantes de tejido cardíaco durante la infección experimental y analizar el impacto de IL-6 en el establecimiento del estado de activación de éstas células.
3. Dilucidar el mecanismo a través del cual IL-6 participa en la sobrevivencia de animales infectados.

## IL-6 determina el influjo de células inflamatorias al miocardio infectado

Teniendo en cuenta que nuestro grupo había reportado previamente que IL-6 induce el reclutamiento de células supresoras mieloides durante la infección experimental<sup>78</sup>, nos propusimos evaluar la participación de esta citoquina en el reclutamiento de células inmunes al tejido cardíaco infectado. Para ello, se infectaron ratones deficientes en IL-6 (IL6KO) y ratones con similar base genética C57BL/6 (WT) con 1.000 trypomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen intraperitonealmente. A los 0, 14 y 21 días post-infección (dpi) se evaluaron en cortes histológicos de tejido cardíaco teñidos con hematoxilina-eosina el infiltrado inflamatorio. Se observó que el tejido cardíaco de animales deficientes presenta un menor grado de miocarditis a lo largo de la cinética comparado con animales WT (Figura 1A-F). Estos resultados fueron corroborados al hacer recuento en cámara de Neubauer de leucocitos infiltrantes de tejido cardíaco disgregado mecánicamente y enzimáticamente (Figura 1G).

Con el objetivo de evaluar la fuente celular de IL-6 que determina la llegada de las células al miocardio infectado, se llevaron a cabo experimentos de transferencia adoptiva que involucran una inyección endovenosa de igual número de células esplénicas WT e IL6KO marcadas con diferentes fluorescentes a 2 dpi a huéspedes WT o IL6KO. Al cabo de 48 horas (4 dpi) se analizó la población de células transferidas en sangre periférica, bazo y corazón de los animales receptores (Figura 2).

A pesar de que en sangre periférica el porcentaje relativo de células WT e IL6KO circulantes fue similar en ambos huéspedes (Figura 3A); al tejido cardíaco de un receptor WT llegan en igual proporción ambas poblaciones (WT e IL6KO), mientras que cuando el parénquima cardíaco es deficiente, llegan mayoritariamente las células capaces de producir IL-6 (Figura 3B). Este efecto fue observado principalmente en macrófagos (F4/80+) cardíacos (Figura 3C). Las células IL6KO transferidas que no llegan a tejido cardíaco deficiente, se mantienen en el bazo, órgano descrito como reservorio de células inmunes (Figura 3D).

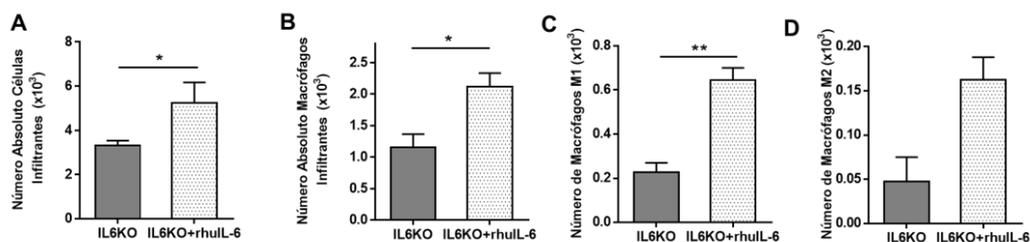


**Figura 1: IL-6 es un mediador crítico en el influjo de leucocitos a miocardio infectado.**

Cortes histológicos representativos a 0, 14 y 21 dpi de tejido cardíaco WT (A, C y E, respectivamente) e IL6KO (B, D y F, respectivamente) teñidos con hematoxilina y eosina. 200x. Número de células infiltrantes de miocardio evaluadas por recuento en cámara de Neubauer (G). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.



macrófagos (Figura 4B), tanto con el fenotipo M1 (CD11b+ F4/80+ CD86+ CD206-) (Figura 4C) como M2 (CD11b+ F4/80+ CD86- CD206+) (Figura 4D). Estos resultados confirman que la IL-6 es clave para el reclutamiento de células inmunes al miocardio infectado.

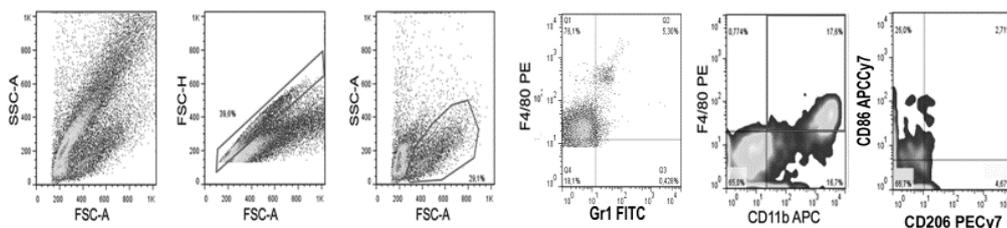


**Figura 4: IL-6 induce reclutamiento de macrófagos a tejido cardíaco infectado.**

Macrófagos IL6KO fueron tratados con una inyección subcutánea de rhuIL-6 (IL6KO + rhuIL-6) antes de infectarlos y 4 dpi se evaluó el número absoluto de células totales (A), macrófagos (B), macrófagos M1 (C) y macrófagos M2 (D) infiltrantes de tejido cardíaco IL6KO e IL6KO + rhuIL-6. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

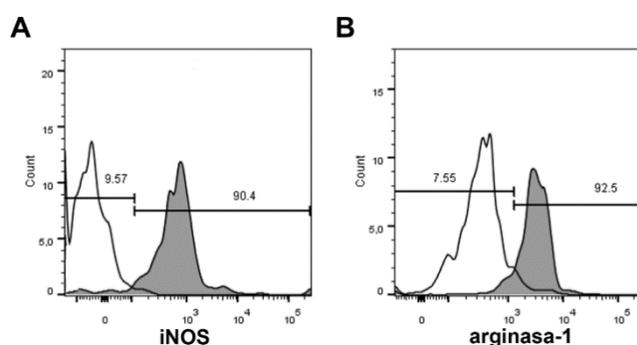
### IL-6 determina el perfil de activación de macrófagos en tejido cardíaco infectado

Considerando que los macrófagos son células claves en la respuesta temprana frente a una injuria, evaluamos el perfil de activación de esta población celular en tejido cardíaco WT e IL6KO a lo largo de la cinética de infección. La población de macrófagos (CD11b+ F4/80+ Gr1-) sería proveniente mayoritariamente de monocitos de circulación ya que presentan baja expresión de F4/80<sup>124</sup>, fueron clasificados como M1 y M2 (Figura 5). Entre los macrófagos M1 (CD11b+ F4/80+ CD86+ CD206-), el  $86,13 \pm 4,10\%$  expresan iNOS, mientras que el  $88,17 \pm 2,17\%$  de los macrófagos M2 (CD11b+ F4/80+ CD86- CD206+) expresan arginasa-1 (Figura 6A y B).



**Figura 5: Gráficos representativos del análisis de citometría de flujo para definir las poblaciones de macrófagos.**

Células infiltrantes de tejido cardíaco fueron obtenidas por separación en gradiente de Percoll. Se excluyeron los dobletes utilizando FSC-H vs FSC-A y luego se identificó la población de células inmunes en FSC-A vs SSC-A. Los macrófagos fueron identificados como células CD11b+F4/80+Gr1- y en esta población se evaluaron macrófagos M1 (CD86+CD206-) y M2 (CD86-CD206+).

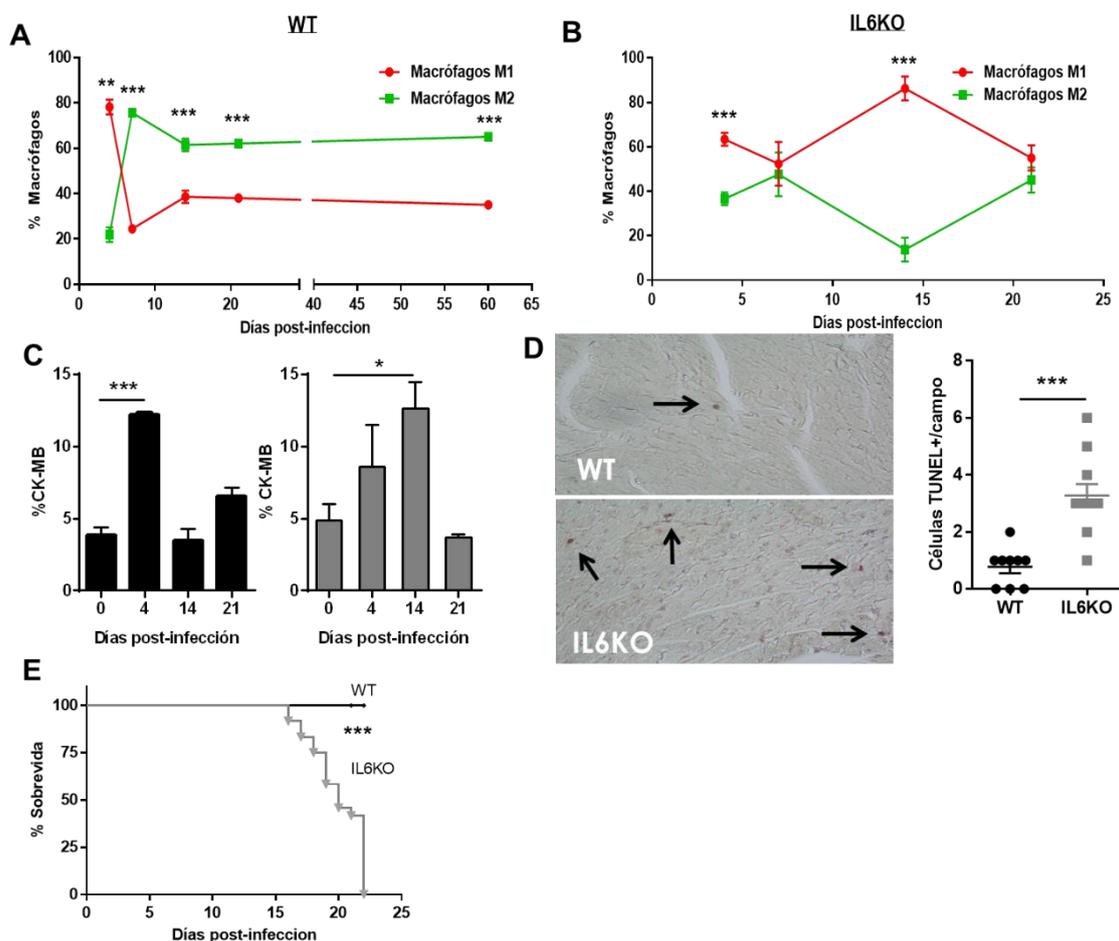


**Figura 6:** Histograma representativo de expresión de enzimas determinantes de perfil en macrófagos M1 (iNOS-A) y M2 (arginasa-1-B) en tejido cardíaco.

El tejido cardíaco de animales WT presentó un predominio de macrófagos con fenotipo M1 tempranamente post-infección (4 dpi), que rápidamente (7 dpi) disminuye mientras incrementan los macrófagos M2, población que prevalece sobre los macrófagos activados clásicamente incluso hasta el día 60 post-infección (Figura 7A). Esta cinética también se observa en animales BALB/c infectados<sup>90</sup>, ilustrando que en tejido cardíaco la activación alternativa de macrófagos representa su principal estado de activación a lo largo de la infección. En contraste, los animales deficientes en IL-6 no presentan un predominio de macrófagos M2 en todos los tiempos analizados (Figura 7B). En ambas cepas de animales el aumento de macrófagos M1 se correlacionó con un incremento en la tasa de creatin-kinasa MB (CK-MB) /CK total, marcador plasmático específico de daño cardíaco (Figura 7C). Interesantemente, a 21 dpi el porcentaje de dicho marcador en los animales IL6KO que sobreviven a la infección disminuyó como consecuencia del incremento excesivo en la CK total, sugiriendo un daño tisular generalizado o falla renal.

El progresivo daño cardíaco también se evidenció en el incremento significativo de células apoptóticas en el tejido deficiente en relación al control (Figura 7D), con la dramática

consecuencia de que todos los animales IL6KO mueren entre el día 16 y 22 post-infección (Figura 7E).



**Figura 7: IL-6 determina el perfil de activación de macrófagos cardíacos.**

Frecuencia relativa de macrófagos con fenotipo M1 (línea roja) y M2 (línea verde) en tejido cardíaco (A) WT y (B) IL6KO. Los porcentajes se expresan como la relación entre ambas poblaciones simple positivas. (C) Porcentaje de CK-MB con respecto a CK total en plasma de animales WT e IL6KO. A 21 dpi el valor de enzimas se midió en plasma de los animales que sobrevivieron. (D) Número de células apoptóticas cuantificadas por técnica de TUNEL en cortes de tejido cardíaco WT (arriba) e IL6KO (abajo). (E) Tasa de supervivencia de animales WT (n = 20, línea negra) e IL6KO (n = 20, línea gris) infectados (test Gehan Breslow Wilcoxon). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

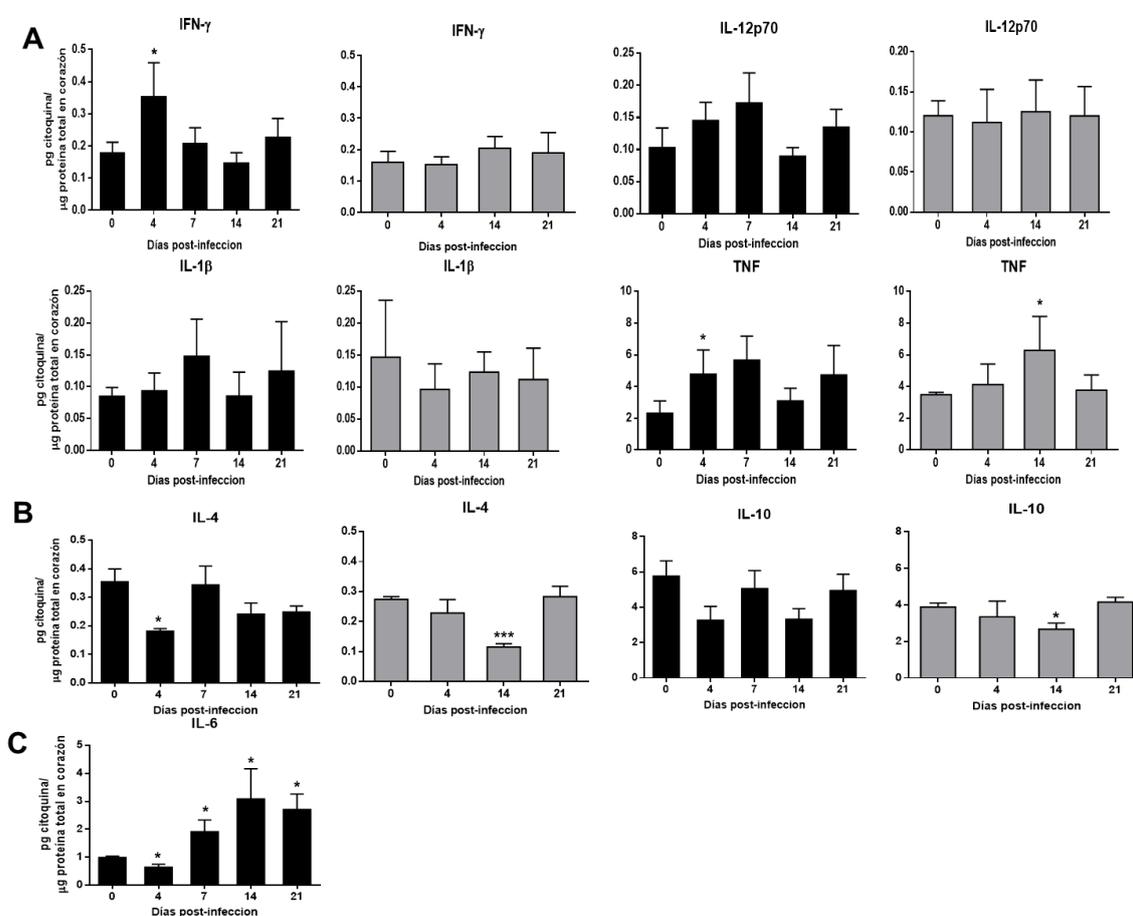
En concordancia con el predominio de macrófagos M1 a 4 dpi, los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- $\gamma$  (factor que induce la maduración a M1) y TNF aumentan significativamente (Figura 8A), mientras que la producción de IL-4 (citoquina polarizante al perfil M2a) disminuye en tejido cardíaco WT (Figura 8B). Por otro lado, concomitante a la inducción del fenotipo M2 de macrófagos, la producción de IFN- $\gamma$  e IL-12p70 disminuye significativamente

a 14 dpi en comparación con 4 dpi. En conjunto estos resultados demuestran que los cambios en los niveles de citoquinas pro- y anti-inflamatorias siguen la cinética del perfil de macrófagos cardíacos.

Es importante destacar que los niveles cardíacos de IL-6 caen al día 4, pero incrementan desde 7 dpi en adelante, siguiendo la cinética de los macrófagos M2 (Figura 8C).

Además, en el corazón deficiente en IL-6, mientras la producción de TNF aumenta, los niveles de IL-4 e IL-10 bajan a 14 dpi, coincidente con el predominio de macrófagos M1 (Figura 8A y B). Los niveles de IFN- $\gamma$  no presentan cambios en los tiempos estudiados.

Estos resultados fuertemente sugieren que IL-6 es un factor clave para determinar la respuesta inmune innata en tejido cardíaco infectado.

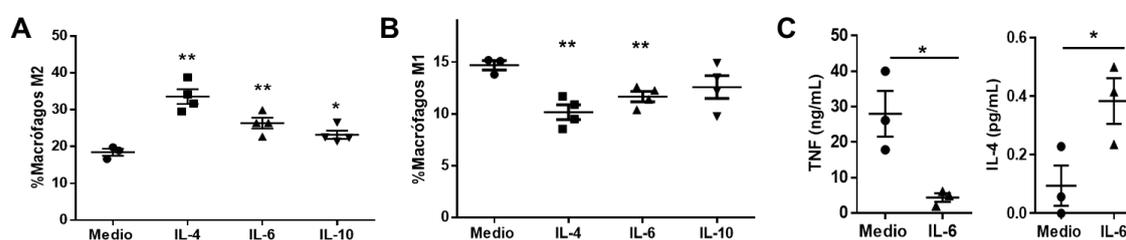


**Figura 8:** Niveles de citoquinas cardíacas asociadas al perfil M1 (A), M2 (B) e IL-6 (C) determinadas por ELISA normalizadas por la concentración total de proteínas cardíacas en ratones WT (barras negras) e IL6KO (barras grises). \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## IL-6 promueve la activación alternativa de macrófagos

Teniendo en cuenta que los macrófagos IL6KO no desarrollaron un perfil M2 predominante en los tiempos estudiados, se evaluó si IL-6 es capaz de promover la activación alternativa de macrófagos *in vitro*. Para ello se cultivaron macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) con IL-6 murina recombinante bioactiva (rmIL-6), observándose un incremento en el porcentaje de macrófagos M2 a niveles comparables a los inducidos por IL-4 o IL-10 (Figura 9A), mientras disminuye la frecuencia de macrófagos M1 (Figura 9B), concomitante con una disminución en los niveles de TNF y un incremento de IL-4 en los sobrenadantes de cultivo (Figura 9C).

Considerando que ADO, uno de los productos de degradación del ATP induce en



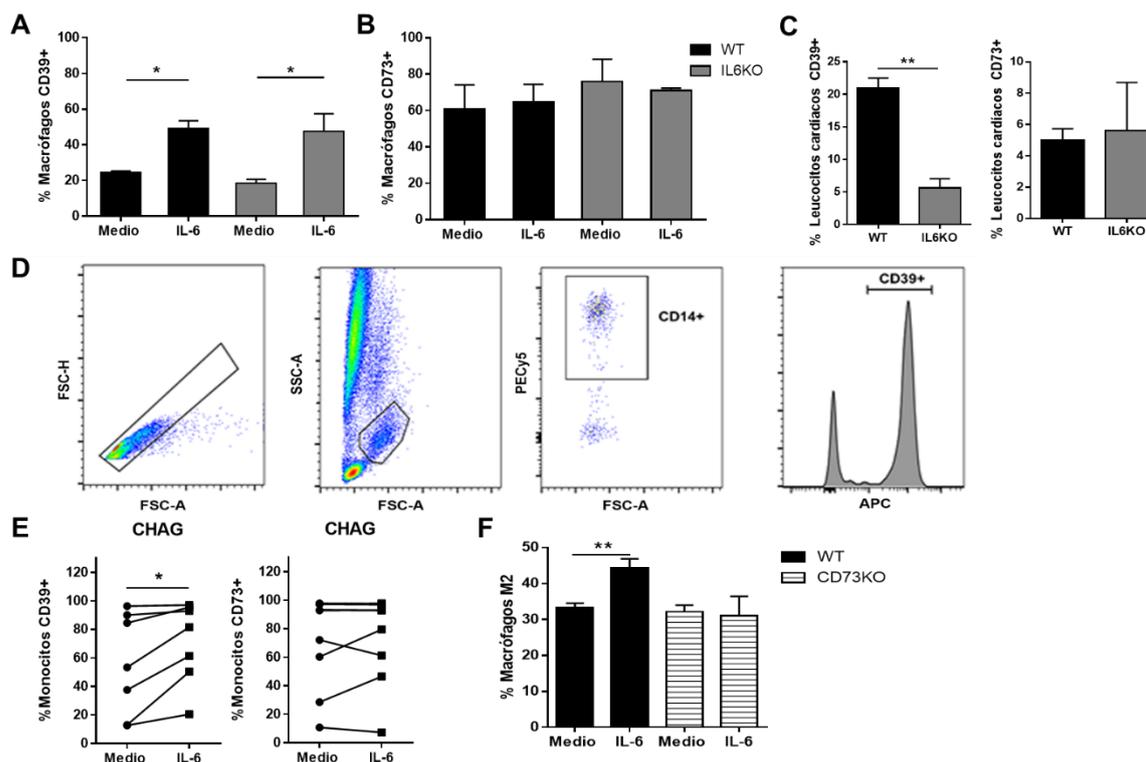
**Figura 9: IL-6 promueve la activación alternativa de macrófagos.**

Frecuencia de macrófagos WT M2 (A) y M1 (B) cultivados con rmIL-4, rmIL-6 o rmIL-10 o mantenidas en medio por 96 horas. Niveles de TNF e IL-4 en sobrenadante de cultivo de macrófagos estimulados con rmIL-6 o mantenidos en medio (C). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

macrófagos cardíacos la polarización al perfil M2, ejerciendo un rol cardioprotectivo en modelos de infarto e isquemia-reperfusión<sup>82,125,126</sup>, evaluamos si IL-6 es capaz de modular la vía purinérgica. Para ello se cultivaron BMDM WT y se observó que rmIL-6 indujo un incremento en la frecuencia de macrófagos que expresan CD39, sin modificar la expresión de CD73 (Figura 10A y B). El mismo efecto se evidenció en BMDM IL6KO. En un total acuerdo con estos resultados, se observó que la frecuencia de leucocitos CD39+ infiltrantes de corazón era mayor en animales WT comparado con animales IL6KO a 21 dpi (Figura 10C).

La capacidad de rhIL-6 de inducir CD39 también se observó en monocitos de pacientes chagásicos (Figura 10D y E). En concordancia con nuestros estudios previos, observamos que rmIL-6 falla en inducir el fenotipo M2 en BMDM con actividad deficiente de CD73 (Figura 10F).

Estos resultados sugieren que IL-6 es capaz de dirigir el cambio desde un ambiente inflamatorio inducido por ATP a través de su metabolismo a ADO, generando un medioambiente anti-inflamatorio.



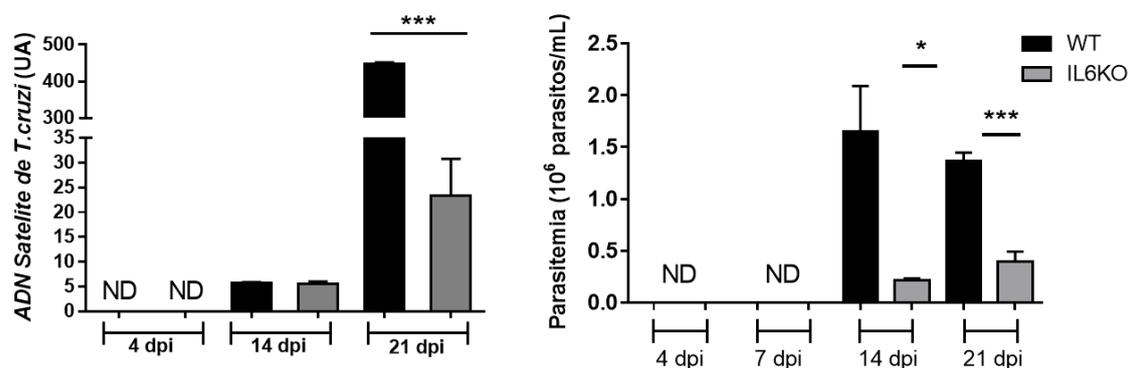
### Los animales deficientes en IL-6 presentan un incrementado estrés oxidativo

**Figura 10: IL-6 induce la activación alternativa de monocitos/macrófagos modulando la vía purinérgica.** Frecuencia de BMDM CD39<sup>+</sup> (A) y CD73<sup>+</sup> (B) cultivados con rIL-6 o mantenidos en medio. Porcentaje de leucocitos infiltrantes de corazón CD39<sup>+</sup> y CD73<sup>+</sup> en animales WT (barras negras) e IL6KO (barras grises) a 21 dpi (C). Estrategia de análisis para evaluar la expresión de CD39 en monocitos de pacientes chagásicos (n=10) (D) y frecuencia de monocitos CD39<sup>+</sup> y CD73<sup>+</sup> luego del estímulo con rhIL-6 (E). Porcentaje de BMDM M2 WT y CD73KO cultivados con rIL-6 o mantenidos en medio (F). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

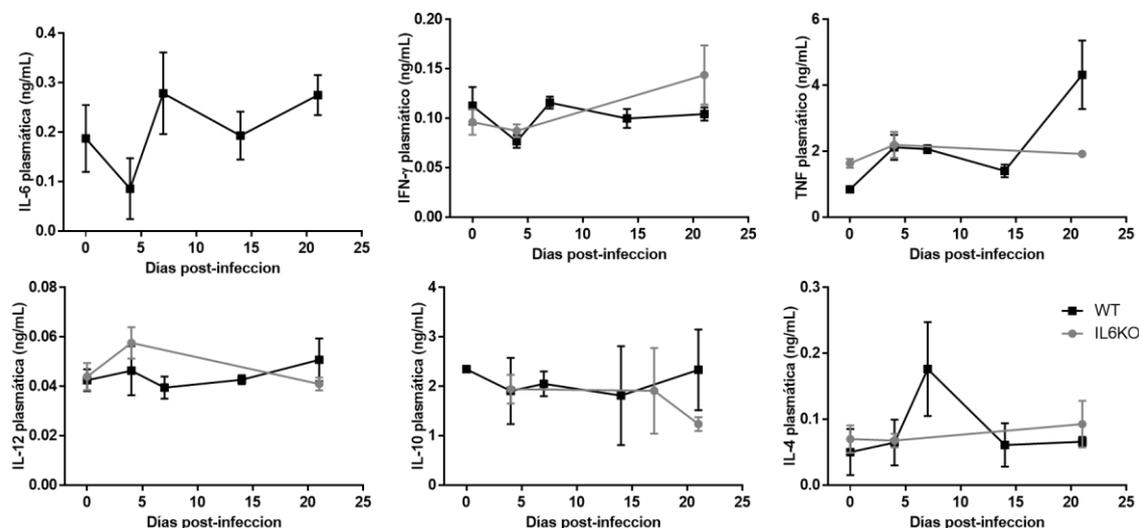
La menor miocarditis observada en los animales deficientes en IL-6, evidenciada como un menor infiltrado cardíaco (Figura 1), nos sugiere un ambiente más permisivo para el crecimiento parasitario. Sin embargo, por el contrario, tanto la parasitemia como la carga parasitaria cardíaca fue menor en animales IL6KO en comparación con animales WT (Figura 11).

Teniendo estos datos en cuenta, se evaluaron diferentes mediadores inflamatorios plasmáticos que podrían estar ejerciendo actividad microbicida. Mientras no se observaron cambios en los niveles plasmáticos de la mayoría de citoquinas testeadas entre ambas cepas de animales (Figura 12), los animales IL6KO presentaron un incremento progresivo de los niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$  a lo largo de la cinética (Figura 13A) con un drástico incremento en los niveles de NO comparado con animales WT a 4 y 21 dpi (Figura 13B). Simultáneamente, se evidenció un incremento en la frecuencia de leucocitos circulantes productores de NO y ERO en sangre periférica de animales IL6KO en comparación con WT (Figura 13C y D), junto a una

incrementada frecuencia de monocitos inflamatorios circulantes en sangre periférica, los principales productores de especies reactivas (Figura 13E).



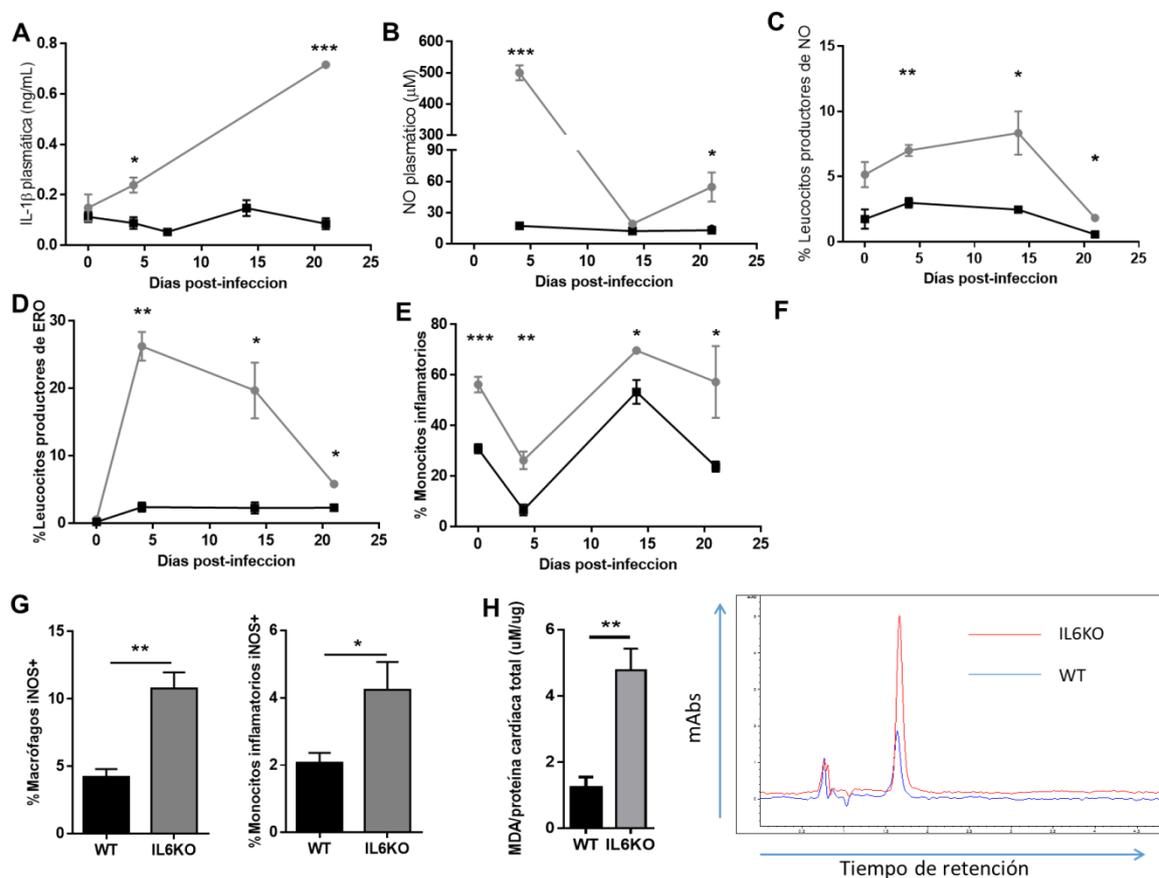
**Figura 11** Carga parasitaria en tejido cardíaco y parasitemia a 14 y 21 dpi en animales WT e IL6KO. \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figura 12:** Niveles plasmáticos de IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-12p70, IL-10 e IL-4 determinados por ELISA en animales WT e IL6KO a diferentes tiempos post-infección.

Paralelamente, los niveles cardíacos de NO presentan un marcado aumento en animales WT e IL6KO a 4 dpi, pero luego mientras que en tejido cardíaco WT disminuyen a lo largo de la infección, en tejido deficiente se mantiene incrementado (Figura 13F). Asimismo, la frecuencia de monocitos circulantes y de macrófagos infiltrantes de tejido cardíaco iNOS<sup>+</sup> fue mayor en animales IL6KO (Figura 13G). Los niveles incrementados de especies reactivas llevaron a mayores niveles cardíacos de malondialdehído (MDA) (marcador de daño oxidativo) en animales deficientes (Figura 13H). Teniendo en cuenta estos resultados, postulamos que las

consecuencias tóxicas del incrementado estrés oxidativo podrían ser las causantes de la mortalidad observada en ausencia de IL-6.



### IL-6 regula la producción de óxido nítrico a través de la modulación de IL-1 $\beta$

Considerando el incrementado ambiente oxidante en los animales deficientes en IL-6 nos propusimos determinar el mecanismo por el cual la misma inhibe la producción de NO. Para ello cultivamos BMDM con LPS (estimulante de la producción de especies reactivas), en combinación con rIL-6 o con anti-IL-1 $\beta$ . El estímulo con IL-6 fue capaz de disminuir tanto la frecuencia de macrófagos productores de NO como su producción en células estimuladas con LPS. El mismo

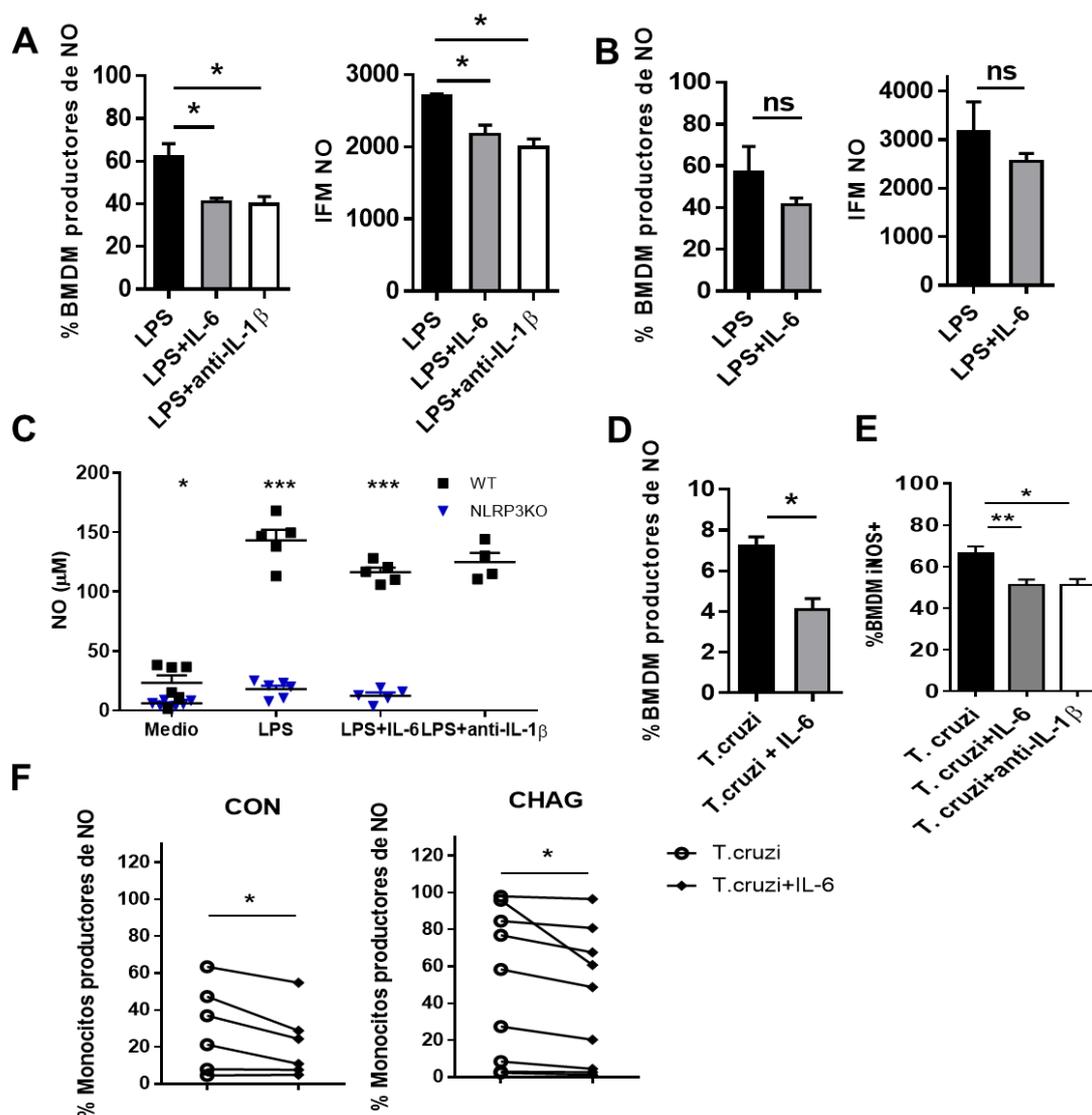
efecto se observó cuando se bloquea IL-1 $\beta$ , evidenciando que la inhibición de esta citoquina frena la producción de NO (Figura 14A).

Para corroborar que el efecto anti-oxidante de IL-6 es dependiente de la activación del inflamosoma, estimulamos BMDM deficientes en NLRP3 (NLRP3KO) con LPS en combinación o no con rmlIL-6. El tratamiento con dicha citoquina no fue capaz de disminuir el estrés oxidativo inducido por LPS en estos cultivos (Figura 14B), por lo que IL-6 lleva a cabo su función anti-oxidante vía la inhibición de la producción de IL-1 $\beta$ . Además, es importante destacar que los niveles de NO en sobrenadantes de cultivo de macrófagos WT fueron significativamente mayores que en macrófagos NLRP3KO (Figura 14C), evidenciando que la producción de NO es altamente dependiente de la activación del inflamosoma.

Para comprobar que el efecto de IL-6 es independiente del estímulo que induce estrés oxidativo, BMDM fueron infectados con *T. cruzi* y luego estimulados o no con rmlIL-6. Observamos que dicha citoquina es capaz de inducir tanto una disminución en la frecuencia de células productoras de NO (Figura 14D), como en la frecuencia de macrófagos iNOS<sup>+</sup> (Figura 14E). El tratamiento con un anticuerpo bloqueante de IL-1 $\beta$  también disminuye el porcentaje de BMDM que expresan iNOS inducida por la infección (Figura 14E).

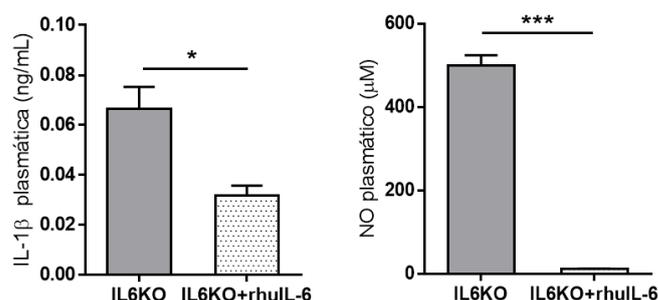
Finalmente, rhIL-6 fue capaz de disminuir la frecuencia de monocitos productores de NO al infectar *in vitro* sangre entera de pacientes controles y chagásicos (Figura 14F).

Con el objetivo de confirmar si IL-6 ejerce su rol anti-oxidante *in vivo*, tratamos animales IL6KO con una inyección subcutánea de rhIL-6. El tratamiento con IL-6 es capaz de disminuir significativamente los niveles sistémicos de IL-1 $\beta$  y NO (Figura 15), confirmando que IL-6 inhibe ambos mediadores inflamatorios.



**Figura 14: IL-6 regula la producción de NO al modular los niveles de IL-1β.**

BMDM WT (A) y NLRP3KO (B) fueron cultivados con LPS solo o en combinación con rmlL-6 o en combinación con anti-IL-1β por 24 horas y se evaluó la frecuencia y producción de NO por sonda fluorescente. Los niveles de NO en sobrenadante de cultivo (C) fueron determinados con reactivo de Griess. Frecuencia de BMDM productores de NO luego de la infección *in vitro* con *T. cruzi* y cultivados o no con rmlL-6 (D). Frecuencia de BMDM infectados *in vitro* que expresan iNOS luego del estímulo con rmlL-6, anti-IL-1β o mantenidos en medio (E). Porcentaje de monocitos/macrófagos de sangre periférica de donantes que producen NO luego de la infección y/o estímulo con rhIL-6 (F). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

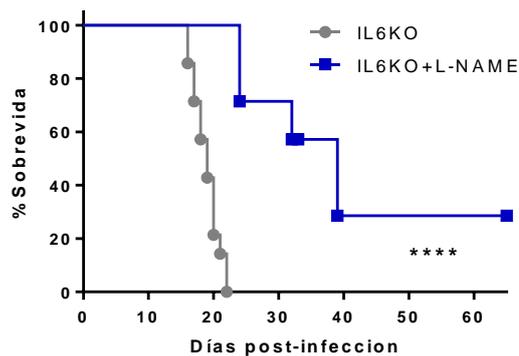


**Figura 15: IL-6 inhibe la producción de IL-1β y NO *in vivo*.**

Niveles plasmáticos de IL-1β y NO de animales IL6KO e IL6KO tratados con rhIL-6 (IL6KO+rhIL-6) a 4 dpi. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## La inhibición de la producción de NO incrementa la sobrevivencia de animales deficientes en IL-6 infectados

Con el objetivo de evaluar si el incrementado estrés oxidativo es el que causa la muerte de los animales deficientes infectados, les administramos L-NAME (inhibidor específico de la producción de NO) en agua de bebida por 7 días desde el día de infección. Observamos que al día 22 post-infección el 100% de los animales sobrevive, presentando una sobrevivencia de 29% a los 65 dpi (Figura 16).



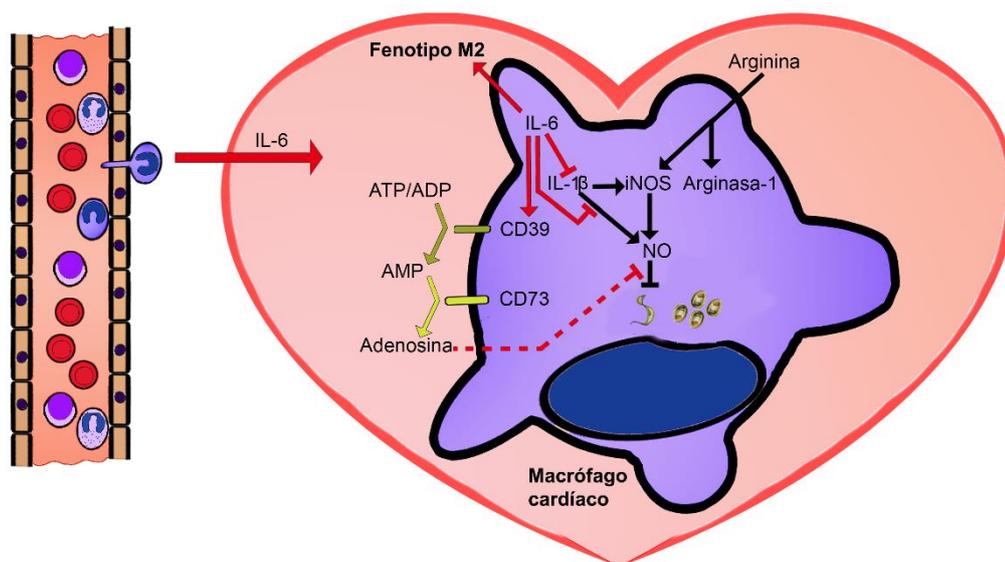
**Figura 16: IL-6 inhibe la producción letal de óxido nítrico.**

Tasa de sobrevivencia de animales IL6KO e IL6KO infectados tratados con L-NAME (IL6KO+L-NAME) en agua de bebida por 7 días (test Gehan-Breslow-Wilcoxon). \*\*\*  $p < 0,001$ .

Estos resultados en conjunto demuestran claramente que IL-6 es capaz de frenar el estrés oxidativo altamente tóxico que causa la muerte de animales deficientes en esta citoquina frente a la infección.

## Conclusiones parciales del Capítulo II

- IL-6 determina el influjo de células inflamatorias al miocardio infectado
- IL-6 promueve la activación alternativa de macrófagos en tejido cardíaco infectado induciendo la maquinaria metabólica para degradar ATP
- Los animales deficientes en IL-6 presentan menor carga parasitaria y un incrementado estrés oxidativo
- IL-6 regula la producción de óxido nítrico a través de la modulación de IL-1 $\beta$
- La inhibición de la producción de óxido nítrico incrementa la sobrevivida de animales deficientes en IL-6 infectados



### **Capítulo III:**

IL-6 promueve sensibilización a la insulina  
controlando desórdenes metabólicos inducidos por  
la infección con *Trypanosoma cruzi*

Considerando los numerosos reportes que describen cómo las especies reactivas regulan la función celular resultando en inflamación e insulinoresistencia, y que IL-6 posee un marcado efecto anti-oxidante, nos planteamos evaluar el papel de IL-6 en el desarrollo del síndrome metabólico.

### **Objetivos**

**General:** Caracterizar el rol de IL-6 en el desarrollo de desórdenes metabólicos en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*.

#### **Específicos:**

1. Evaluar el estado metabólico de los ratones deficientes en IL-6 a lo largo de la infección con *Trypanosoma cruzi*.

2. Caracterizar el impacto de la deficiencia de IL-6 en el perfil de macrófagos infiltrantes de tejido adiposo visceral como órgano endócrino sensor de insulinoresistencia.

3. Estudiar comparativamente la existencia de daño renal y hepático en animales deficientes y salvajes durante la infección.

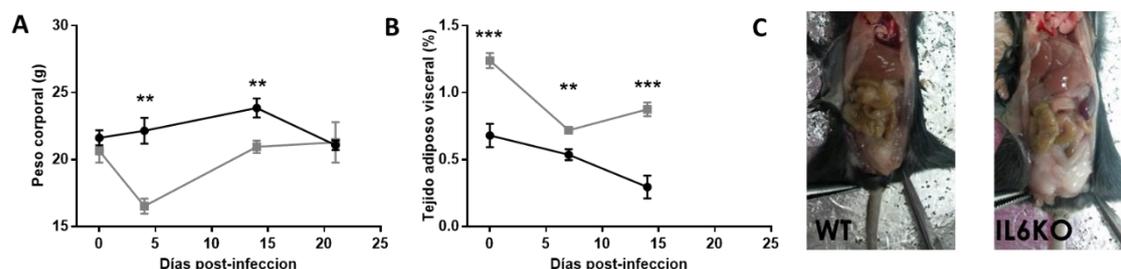
4. Caracterizar el rol de IL-6 en la sensibilidad a la insulina modulando la expresión de los receptores CD36 y TLR4.

## Los animales deficientes en IL-6 presentan insulinoresistencia aguda

El estudio de la potencial participación del estrés oxidativo en el desarrollo del síndrome metabólico presenta un incrementado interés en el último tiempo. Resultados recientes demuestran que el aumento en el estrés oxidativo tendría un importante rol en manifestaciones asociadas al síndrome metabólico incluyendo aterosclerosis, hipertensión y diabetes tipo 2<sup>127</sup>, y en insulinoresistencia<sup>128</sup> sugiriendo que el incremento de las especies oxidantes sería un evento temprano en la patología de estas enfermedades crónicas, más que una mera consecuencia.

Teniendo en cuenta el dramático estrés oxidativo sistémico observado en animales infectados deficientes en IL-6 (Capítulo II), nos propusimos evaluar parámetros metabólicos.

En cuanto a los parámetros morfométricos, los animales deficientes en IL-6 presentaron menor peso corporal al día 4 y 14 post-infección en comparación con ratones WT (Figura 1A). Mientras que a todos los tiempos estudiados, el porcentaje de tejido adiposo visceral (TAV) fue mayor en los animales IL6KO (Figura 1B) como puede observarse en la imagen representativa de la Figura 1C.



**Figura 1: Los animales deficientes en IL-6 presentan un incremento en tejido adiposo visceral.**

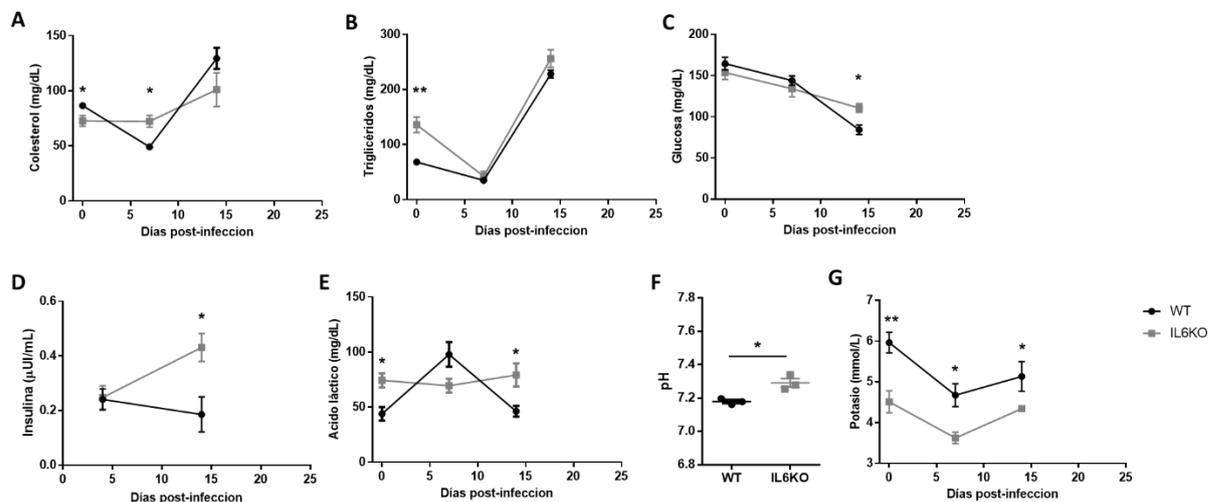
(A) Peso corporal y (B) porcentaje de TAV relativo al peso de animales WT (línea negra) e IL6KO (línea gris) a diferentes tiempos post-infección. (C) Fotografías representativas de TAV en animales WT e IL6KO a 14 dpi. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Al evaluar diferentes parámetros metabólicos, observamos previo a la infección un incremento en los niveles de triglicéridos, mientras que el colesterol y la glucemia aumentan en animales IL6KO, a 7 dpi y a 14 dpi respectivamente (Figura 2A, B y C). Interesantemente, los niveles de insulina fueron mayores en plasma de los animales deficientes (Figura 2D), evidenciando resistencia aguda a la insulina. El aumento de glucemia y de insulina en los animales IL6KO evidencian una resistencia a la insulina aguda.

A pesar de que los niveles de ácido láctico fueron mayores en plasma de animales deficientes en IL-6 a 14 dpi, el pH plasmático fue mayor (Figura 2E y F). Además, los niveles de

potasio fueron menores en animales IL6KO en todos los tiempos estudiados (Figura 2G), sugiriendo que el eflujo de potasio actuaría como mecanismo de activación del inflamósoma.

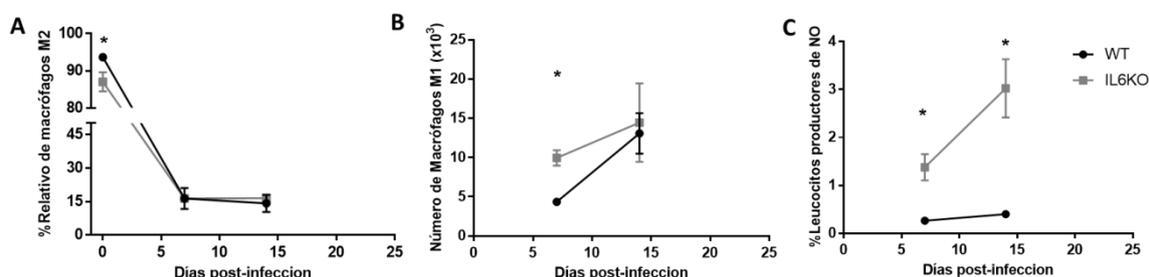
Estos resultados nos sugieren que la IL-6 sería clave para la regulación de la sensibilidad a la insulina, por lo que los animales deficientes en IL-6 presentarían síndrome metabólico.



**Figura 2: Los animales deficientes en IL-6 presentan incrementados niveles de glucemia y de insulina.** Niveles de colesterol (A), triglicéridos (B), glucosa (C) e insulina plasmáticos (D) y ácido láctico (E), pH (F) y potasio (G) evaluados en animales WT e IL6KO a diferentes tiempos post-infección. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### El tejido adiposo visceral de animales deficientes en IL-6 presenta mayor número de macrófagos M1 e incrementado estrés oxidativo

Teniendo en cuenta que el tejido adiposo es el órgano que responde primero a la resistencia a la insulina, evaluamos allí poblaciones de macrófagos. Se observó mayor número de macrófagos M1 (Figura 3B) y mayor frecuencia de leucocitos productores de NO en TAV deficiente en IL-6 (Figura 3C).



**Figura 3: Los leucocitos de TAV deficiente en IL-6 producen más óxido nítrico.**

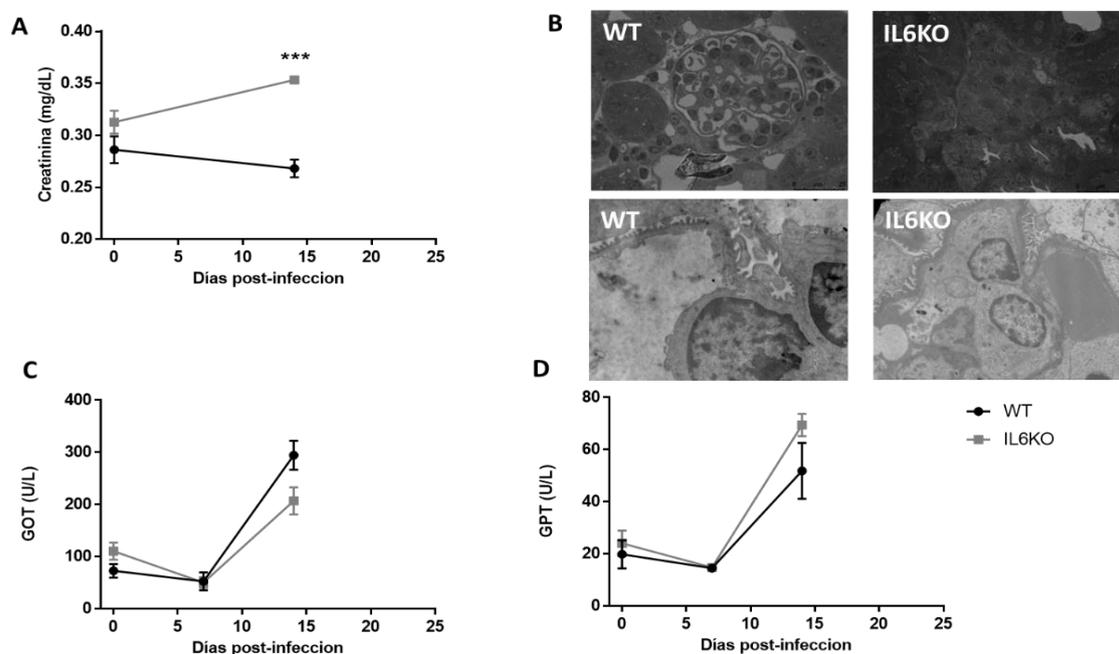
Frecuencia relativa de macrófagos M2 (A), número absoluto de macrófagos M1 (B) y porcentaje de leucocitos productores de NO (C) infiltrantes de TAV WT ( $n = 5$ ) e IL6KO ( $n = 4$ ) a diferentes tiempos post-infección. \*  $p < 0,05$  WT vs IL6KO. Cada punto representa el promedio de los animales de cada cepa estudiados a cada tiempo.

En línea con resultados previos, evidenciamos como la composición de macrófagos en tejido adiposo es dinámica y modulan la sensibilidad a la insulina. Mientras los macrófagos M2 son inmunoregulatorios, los M1 interrumpen la sensibilidad a la insulina en TAV y generan más inflamación a través de la producción de especies reactivas.

### **La ausencia de IL-6 se asocia a incrementado daño renal**

En línea con lo expuesto previamente, reportes previos proponen que el estrés oxidativo sería un evento temprano en el desarrollo del síndrome metabólico y no una simple consecuencia del aumento de la glucemia. El estrés oxidativo es mayor en pacientes con alteraciones en la función renal, llevando a disfunción endotelial. Teniendo estos datos en cuenta, nos planteamos evaluar si los animales deficientes en IL-6 presentaban alteraciones en la estructura y funcionalidad renal como consecuencia del gran estrés oxidativo y de la sobrecarga de glucosa.

Paralelamente con el incremento dramático en los niveles de CK total en los animales deficientes (Capítulo II), indicativo de falla renal, se observaron mayores niveles de creatinina plasmática al día 14 post-infección en los animales IL6KO comparado con los animales WT (Figura 4A). El análisis de microscopía electrónica evidenció mayor daño en animales deficientes



**Figura 4: Los animales deficientes en IL-6 presentan incrementado daño renal.**

Niveles plasmáticos de creatinina (**A**), GOT (**C**) y GPT (**D**). Imágenes representativas de cortes semifinos (arriba) y microscopía electrónica (abajo) de tejido renal WT (izquierda) e IL6KO (derecha) a 14 dpi (**B**). \*\*\*  $p < 0,001$ . Los puntos representan el promedio del grupo de animales de cada cepa a los diferentes tiempos post-infección.

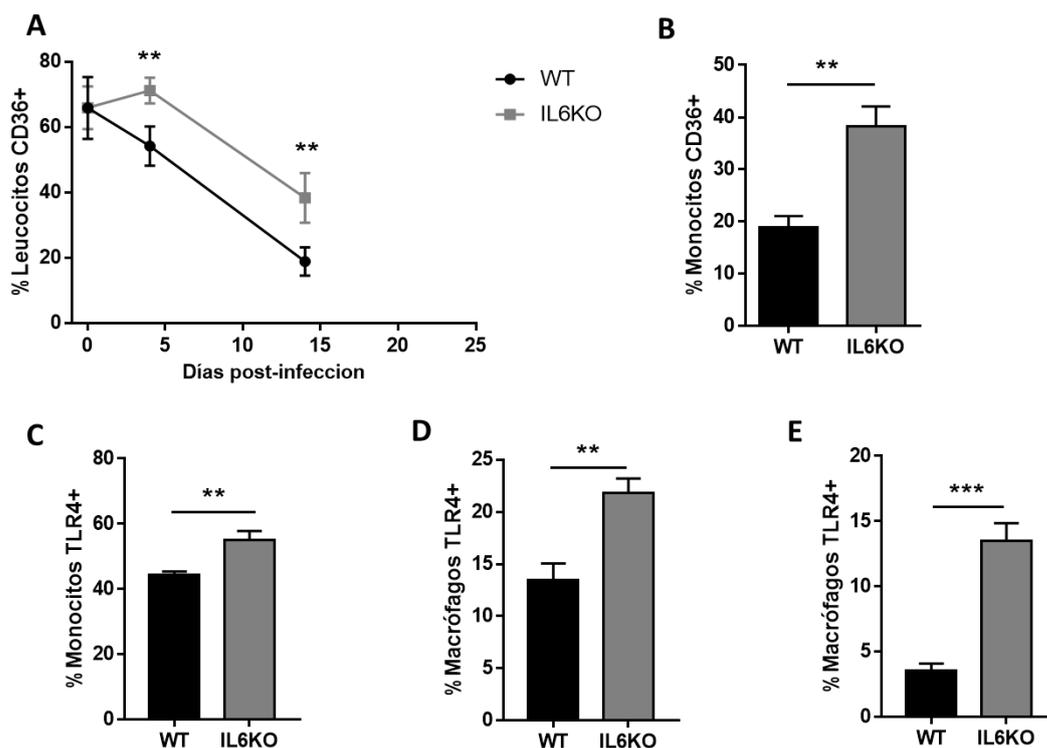
en IL-6 (Figura 4B). Mientras, los niveles plasmáticos de transaminasas hepáticas fueron similares entre ambas cepas en todos los tiempos estudiados (Figura 4C y D).

### **La deficiencia de IL-6 se asocia a una mayor expresión de TLR4 y de CD36 en células fagocíticas mononucleares circulantes**

Teniendo en cuenta el incrementado estrés oxidativo sistémico y cardiovascular descrito en animales deficientes en IL-6, es posible pensar que los lípidos circulantes, en particular LDL son más susceptibles a sufrir oxidación. En línea con esto, evaluamos la expresión del receptor basurero CD36 por su reportada capacidad para captar LDL oxidadas presentando como consecuencia disfunción de células tubulares, daño mitocondrial de podocitos y consecuentemente, disminución de la función renal<sup>129</sup>. Evidenciamos a lo largo de la infección una mayor expresión de CD36 en leucocitos deficientes en IL-6 en comparación con los WT (Figura 5A), particularmente en la población de monocitos (Figura 5B).

Recientes reportes proponen que CD36 dispararía la producción de IL-1 $\beta$  vía activación del heterodímero TLR4/TLR6 en respuesta a LDL oxidadas, sugiriendo que CD36 facilitaría la activación del inflamosoma<sup>130</sup>.

Teniendo esto en cuenta y considerando que se reportó un incremento en la expresión de TLR4 en monocitos y neutrófilos de pacientes con falla renal, que ratones deficientes en TLR4 desarrollan menos fibrosis renal, y que se encuentran en desarrollo numerosos trial clínicos que proponen el bloqueo de TLR4 como tratamiento de enfermedades cardiovasculares, evaluamos la expresión de este RRP en células circulantes de animales infectados. En línea con la literatura, observamos una mayor frecuencia de monocitos en sangre periférica, macrófagos cardíacos y macrófagos en TAV TLR4+ de animales deficientes en IL-6 en comparación con animales WT a 14 dpi (Figura 5C, D y E).



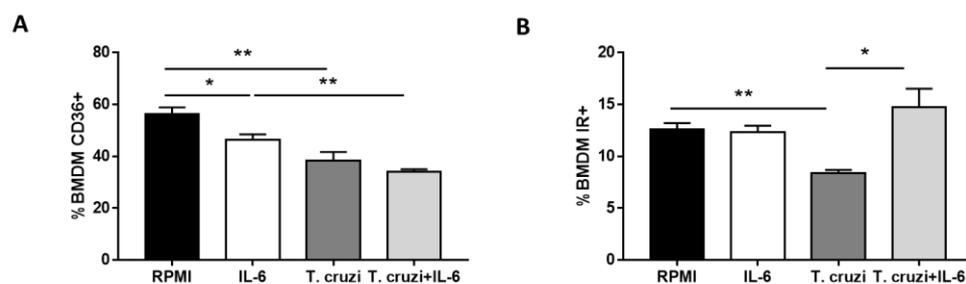
**Figura 5: Los animales IL6KO presentan mayor expresión de TLR4 y de CD36 en células fagocíticas mononucleares circulantes.**

Frecuencia de leucocitos CD36+ evaluado a lo largo de la cinética (A) y monocitos de sangre periférica CD36+ (B) y TLR4+ (C) a 14 dpi. Porcentaje de macrófagos TLR4+ en tejido cardíaco (D) y tejido adiposo visceral (E) WT e IL6KO a 14 dpi. \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

## IL-6 regula la sensibilidad a la insulina inhibiendo la expresión de CD36

Teniendo en cuenta reportes previos que le asignan a la señalización de CD36 una disminución en la respuesta a la insulina, nos propusimos evaluar si IL-6 es capaz de modular dicha vía. Para ello se cultivaron BMDM WT con IL-6, con *T. cruzi*, *T. cruzi* e IL-6 o se mantuvieron en medio. Observamos que tanto rIL-6 como la infección fueron capaces de inducir una disminución en la frecuencia de células que expresan CD36 (Figura 6A).

En línea con los resultados obtenidos, mientras el cultivo con *T. cruzi* induce una disminución en la frecuencia de células que expresan el receptor de insulina (frenando la sensibilidad), el agregado de rIL-6 a los cultivos infectados restituye la capacidad de respuesta/sensibilidad a la insulina (Figura 6B).



**Figura 6: IL-6 induce sensibilidad a la insulina.**

Frecuencia de BMDM CD36+ (**A**) e IR+ (**B**) evaluado por citometría de flujo luego del tratamiento con rmlL-6, *T. cruzi* (1:1), ambos o mantenidos en medio por 24 horas. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

El efecto de IL-6 de disminuir la expresión de CD36 -receptor de LDL- en macrófagos develaría el mecanismo a través del cual esta citoquina frena la activación del inflamósoma, el incrementado estrés oxidativo y finalmente, la consecuente resistencia a la insulina.

### **Conclusiones parciales del capítulo III**

- La deficiencia de IL-6 lleva a insulinoresistencia aguda evidenciada por un incremento de insulina, pero también de glucosa
- Los animales deficientes en IL-6 presentan incrementado estrés oxidativo en tejido adiposo visceral y mayor daño renal
- Los animales deficientes en IL-6 presentan más frecuencia de monocitos/macrófagos CD36+ y TLR4+
- IL-6 disminuye la expresión de CD36, restituyendo la sensibilidad a la insulina

## **Capítulo IV:**

Interleuquina-6 revierte la disfunción de  
linfocitos citotóxicos en la enfermedad de  
Chagas humana

Teniendo en cuenta que se reportó una menor frecuencia de células T CD8+ específicas en pacientes con cardiopatía chagásica en comparación con aquellos asintomáticos, conocer la calidad de la respuesta citotóxica durante la enfermedad de Chagas es determinante para comprender y poder determinar el progreso de dicha patología.

## **Objetivos**

**General:** Caracterizar la respuesta efectora de linfocitos T citotóxicos en pacientes con enfermedad de Chagas crónica asintomáticos.

### **Específicos:**

1. Evaluar la frecuencia de poblaciones de linfocitos circulantes y su susceptibilidad a la muerte celular en pacientes seropositivos y donantes controles.
2. Determinar la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y sus consecuencias funcionales en las células de pacientes chagásicos y donantes controles.
3. Evaluar los niveles de citoquinas y mediadores solubles en plasma.
4. Analizar los mecanismos gatillados por IL-6 en células mononucleares de donantes controles infectadas *in vitro*.

## Los pacientes seropositivos presentan un menor número de linfocitos T CD8+ en sangre periférica

Un total de 46 muestras de sangre periférica de donantes seronegativos y seropositivos de ambos sexos que viven en Córdoba (Argentina) y cumplen con los criterios de inclusión y exclusión (ver anexo I), se analizaron para detectar anticuerpos específicos contra *T. cruzi* por ELISA y hemaglutinación indirecta (Tabla I). La mediana de título para anticuerpos anti-*T. cruzi* detectados por HAI fue 1/256 (título de corte local 1/32). Sólo un paciente presentó bloqueo completo de la rama derecha, hemibloqueo anterior izquierdo y dilatación auricular izquierda, características clínicas de cardiomiopatía chagásica. Los pacientes seropositivos mostraron un porcentaje y número absoluto de linfocitos T (CD3+) en sangre periférica significativamente menor en comparación con los donantes seronegativos. Si bien no se observaron diferencias en el porcentaje y número absoluto de células T cooperadoras (CD3+ CD4+), la frecuencia y número de células T citotóxicas (CD3+ CD8+) fueron significativamente más bajos en pacientes seropositivos que en seronegativos (Tabla II), no evidenciándose diferencias en el número de linfocitos B (CD20+) entre los grupos analizados (Tabla II).

	Donantes Controles (n = 24)	Pacientes Chagásicos (n = 22)
<b>Edad (años)</b>		
Rango	25-60	25-48
Mediana	30	32
<b>Género</b>		
Femenino	n=16	n=17
Masculino	n=8	n=5
<b>Evaluación clínica</b>		
Cambios electrocardiográficos	NE	n=1 *
Cambios ecocardiográficos	NE	n=1 #
Anormalidades en rayos X	NE	n=0
* Bloqueo Completo de Rama Derecha y hemibloqueo anterior izquierdo		
# Dilatación leve de aurícula izquierda		
NE No evaluado		

**Tabla I:** Datos clínicos y demográficos de donantes controles y pacientes chagásicos.

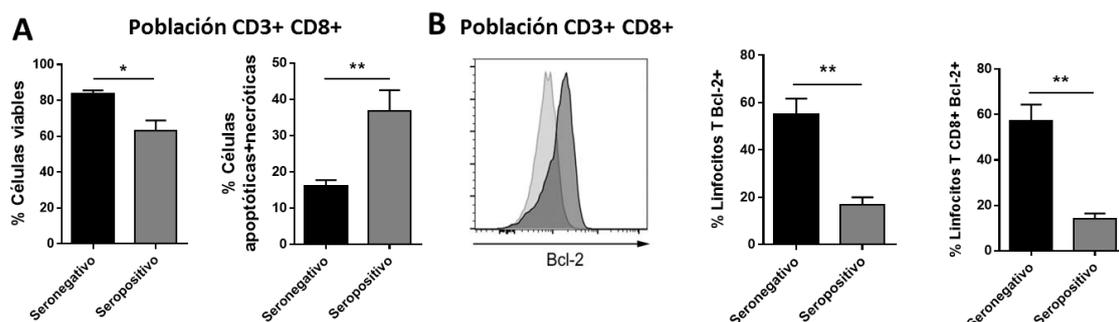
	Donantes Controles (n=15)	Pacientes chagásicos (n=8)	Valor de p
<b>Subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica</b>			
CD3+ (%)	58,6 ± 3,9	43,2 ± 5,3	*p = 0,03
CD3+/ $\mu$ L (Número absoluto)	1139 ± 102	754 ± 135	*p = 0,04
CD3+CD4+ (%)	58,7 ± 3,7	57,6 ± 2,0	p = 0,84
CD3+CD4+/ $\mu$ L (Número absoluto)	600 ± 72	535 ± 65	p = 0,59
CD3+CD8+ (%)	39,9 ± 3,5	30,74 ± 2,20	*p = 0,04
CD3+CD8+/ $\mu$ L (Número absoluto)	381 ± 56	193 ± 32	*p = 0,049
CD20+ (%)	14,1 ± 1,5	12,3 ± 1,6	p = 0,44
CD20+/ $\mu$ L (Número absoluto)	305 ± 40	218 ± 32	p = 0,16
Los valores están expresados como media $\pm$ error estándar			
* p<0,05 es significativo			

**Tabla II:** Frecuencia y número absoluto de linfocitos T (CD3+), linfocitos T cooperadores (CD3+ CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) y linfocitos B (CD20+) en sangre periférica de donantes controles y pacientes chagásicos.

### Los linfocitos T citotóxicos de pacientes chagásicos presentan mayor muerte celular y menor expresión de la molécula anti-apoptótica Bcl-2

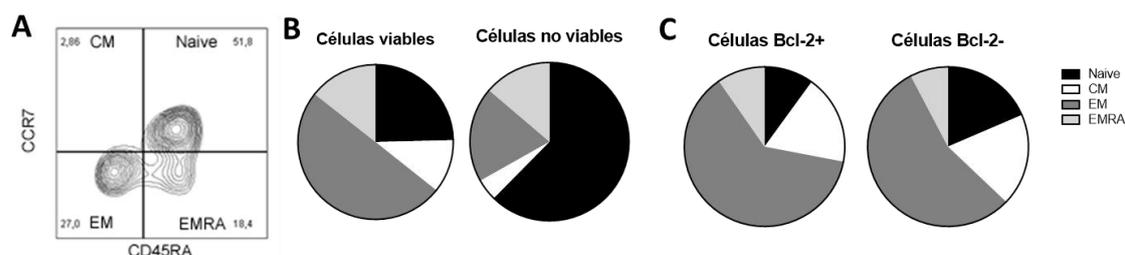
Teniendo en cuenta el menor número de células citotóxicas circulantes en pacientes chagásicos, evaluamos si estas células presentaban mayor muerte celular. A través de tinción con Annexina V y 7-AAD observamos que los linfocitos T CD8+ de pacientes chagásicos mostraron un disminuido porcentaje de células viables (Annexina V- 7-AAD-), y concomitantemente, una tasa más alta de células apoptóticas (Annexina V+ 7-AAD-) y necróticas (Annexina V+/- 7-AAD+) en comparación con donantes controles (Figura 1A). En concordancia, la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 fue significativamente mayor en los linfocitos citotóxicos de individuos seronegativos (Figura 1B).

Con el objetivo de evaluar qué población de células citotóxicas es las más susceptible a la muerte celular, realizamos tinción con anti-CCR7 y anti-CD45RA y utilizamos la estrategia de selección de células (*gate*) representada en la Figura 2A. Entre las células T citotóxicas de pacientes chagásicos, las células vírgenes (*naïve*) fueron el fenotipo más susceptible a la muerte (células viables vs células no viables: 24,53  $\pm$  6,11 vs 62,48  $\pm$  3,95%). Por el contrario, las células T citotóxicas de memoria efectora mostraron un aumento significativo de la tasa de viabilidad (células viables vs células no viables: 49,75  $\pm$  3,06 vs 19,48  $\pm$  2,45%) (Figura 2B). La frecuencia de las células naïve negativas para la expresión intracelular de Bcl-2 fue significativamente menor que las células naïve Bcl-2+ (Bcl-2+ vs Bcl-2-: 9,95  $\pm$  0,87 vs 17,67  $\pm$  2,07) (Figura 2C). Además, el porcentaje de células CD8+ de memoria efectora fue mayor en sujetos chagásicos en comparación con donantes seronegativos (Figura 3).



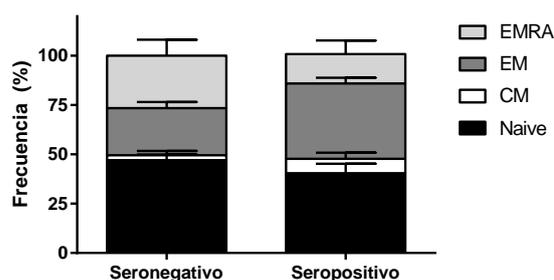
**Figura 1: Los linfocitos T citotóxicos de pacientes seropositivos presentan mayor muerte celular y menor expresión de la molécula anti-apoptótica Bcl-2.**

(A) Porcentaje de células CD3+ CD8+ viables y apoptóticas/necróticas analizadas por tinción de Annexina-V y 7AAD en pacientes seropositivos (n=5) y donantes seronegativos (n=8). (B) Histograma representativo y frecuencia de células Bcl-2+ en subpoblación de linfocitos CD3+ CD8+ de pacientes seropositivos (línea gris clara; n=5) y donantes seronegativos (línea gris oscura; n=5). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.



**Figura 2: Las células CD8+ naïve presentan mayor muerte celular.**

(A) Gráfico de densidad representativo que muestra la estrategia para dividir las poblaciones de células T CD8+ (naïve, memoria central (CM), la memoria efectora (EM) y memoria terminalmente diferenciada (EMRA)). (B) Frecuencia de células CD8+ vírgenes/naïve, memoria central (CM), memoria efectora (EM) y memoria efectora terminalmente diferenciada (EMRA) en linfocitos CD8+ viables (7AAD-) o no viables (7AAD+) de pacientes seropositivos (n = 4) (naïve viable vs naïve no viable p = 0,002; EM viable vs EM no viable p= 0,0002). (C) Frecuencia de células CD8+ vírgenes/naïve, CM, EM y EMRA en linfocitos Bcl-2+ o Bcl-2- de pacientes chagásicos (n = 4) (Bcl-2+ naïve vs Bcl-2- naïve p = 0,0123).

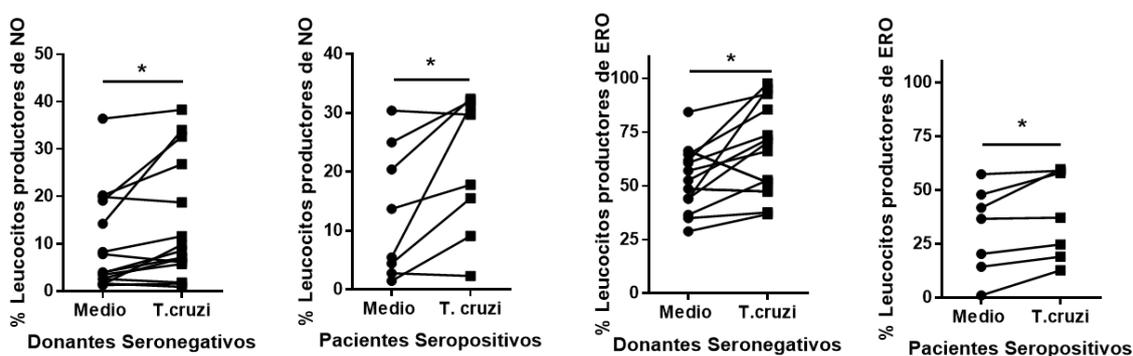


**Figura 3: Los pacientes seropositivos mostraron un mayor porcentaje de células T CD8+ de memoria efectora.**

Frecuencia de subpoblaciones de células T CD8+ en pacientes seropositivos y seronegativos (%EM% en los donantes control vs %EM en sujetos seropositivos p = 0,047).

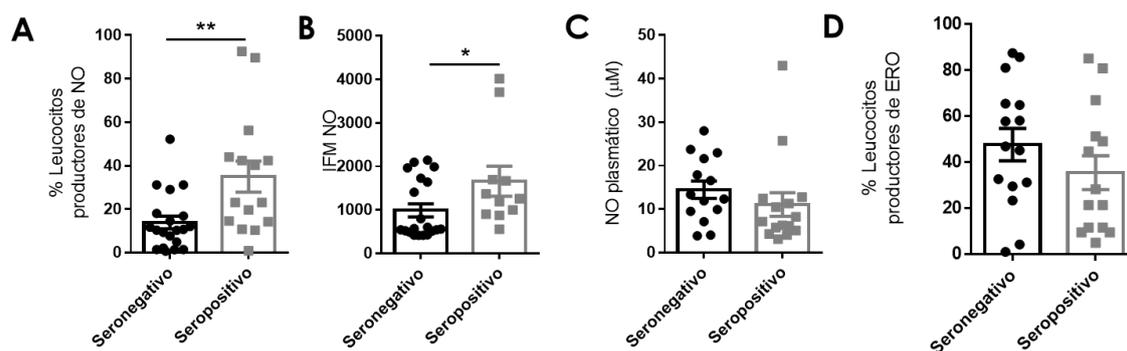
## Los pacientes chagásicos presentan una mayor frecuencia de leucocitos productores de óxido nítrico en sangre periférica

Teniendo en cuenta que observamos que la infección *in vitro* con trypomastigotes de sangre entera de donantes controles y de pacientes chagásicos aumentó significativamente el porcentaje de leucocitos productores de NO y ERO (Figura 4), nos propusimos evaluar la producción de dichas especies oxidantes en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Se observó que los pacientes seropositivos muestran un mayor porcentaje de leucocitos productores de NO (Figura 5A), con una mayor producción de NO por célula (Figura 5B). En concordancia con reportes previos, no se observaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de NO en comparación con los sujetos seronegativos (Figura 5C), ni en los leucocitos productores de ERO (Figura 5D).



**Figura 4: La infección *in vitro* con *Trypanosoma cruzi* induce la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.**

Frecuencia de leucocitos productores de NO y ERO luego de la infección *in vitro* con *Trypanosoma cruzi* de sangre periférica de donantes controles (n = 15) y pacientes seropositivos (n = 8) por 24 horas.  
\* p < 0,05.

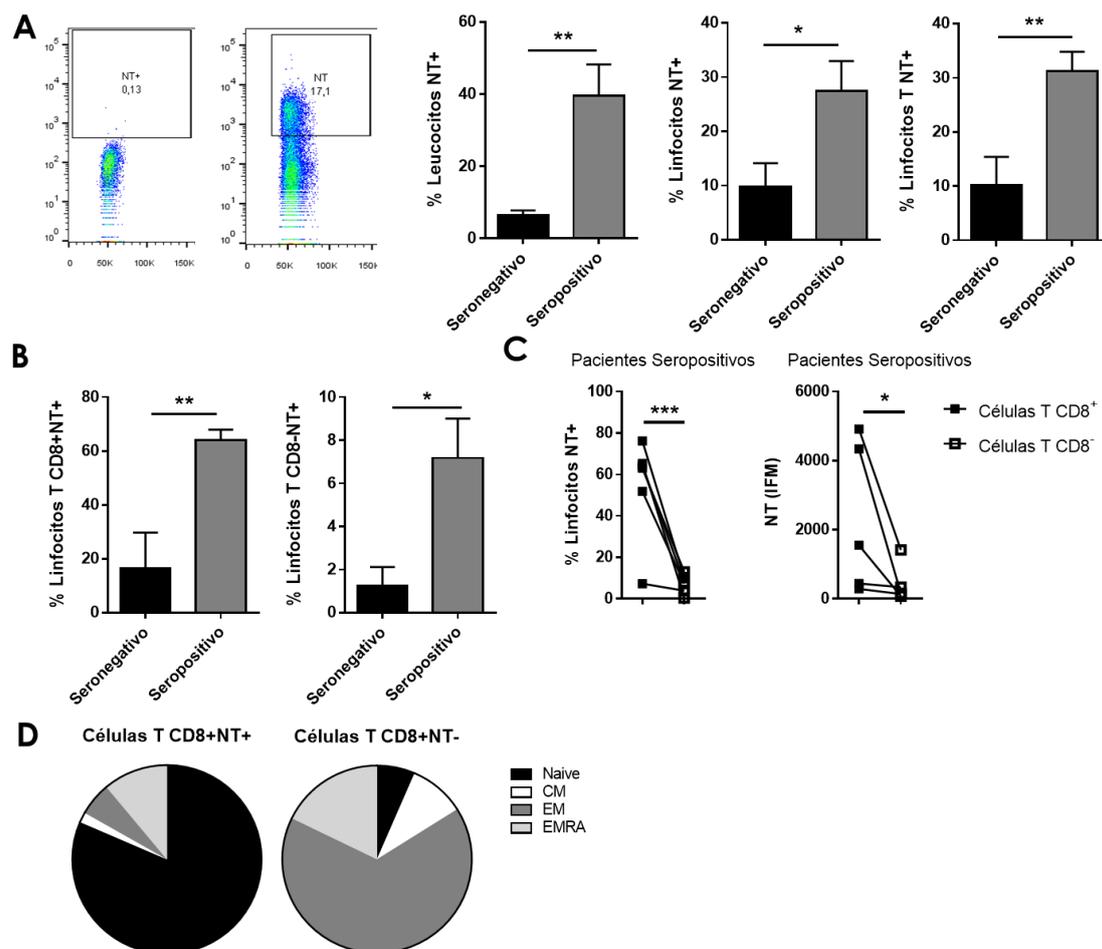


**Figura 5: Los pacientes chagásicos presentan una mayor frecuencia de leucocitos productores de óxido nítrico en sangre periférica.**

Porcentaje de leucocitos productores de óxido nítrico **(A)** y de ERO **(D)** de pacientes seropositivos ( $n = 15$ ) y donantes seronegativos ( $n = 20$ ). **(B)** Intensidad de fluorescencia media (IFM) de óxido nítrico en leucocitos de pacientes seropositivos ( $n = 11$ ) y donantes controles ( $n = 20$ ). **(C)** Niveles de óxido nítrico medido con reactivo de Griess en plasma de pacientes seropositivos ( $n = 14$ ) y seronegativos ( $n = 14$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

### Los pacientes chagásicos presentan mayor nitración de residuos tirosina en las células T CD8+

Con el objetivo de medir el efecto del incrementado estrés oxidativo observado en los pacientes seropositivos, se evaluó el daño causado en las proteínas analizando la nitración de residuos tirosina (NT) utilizando un anticuerpo fluorescente que reconoce NT en la superficie de células inmunes circulantes a través de citometría de flujo. La NT fue significativamente menor en leucocitos, linfocitos y células T (Figura 6A) y particularmente en linfocitos T CD8+ y CD8- (Figura 6B) de donantes no chagásicos comparado con pacientes chagásicos. Sin embargo, en éstos pacientes el efecto fue significativamente mayor en la superficie de linfocitos T CD8+ en comparación con las células T CD8- (Figura 6C). Entre las células citotóxicas nitradas de pacientes chagásicos, se identificaron a los linfocitos naïve como la principal subpoblación que sufre nitración de tirosina (NT+ vs NT-  $81,45 \pm 3,00$  vs  $6,50 \pm 1,61\%$ ). Por el contrario, la mayoría de las células no nitradas (NT-) fueron células T CD8+ de memoria efectora (NT+ vs NT-  $5,73 \pm 1,22$  vs  $66,33 \pm 4,46\%$ ) (Figura 6D).



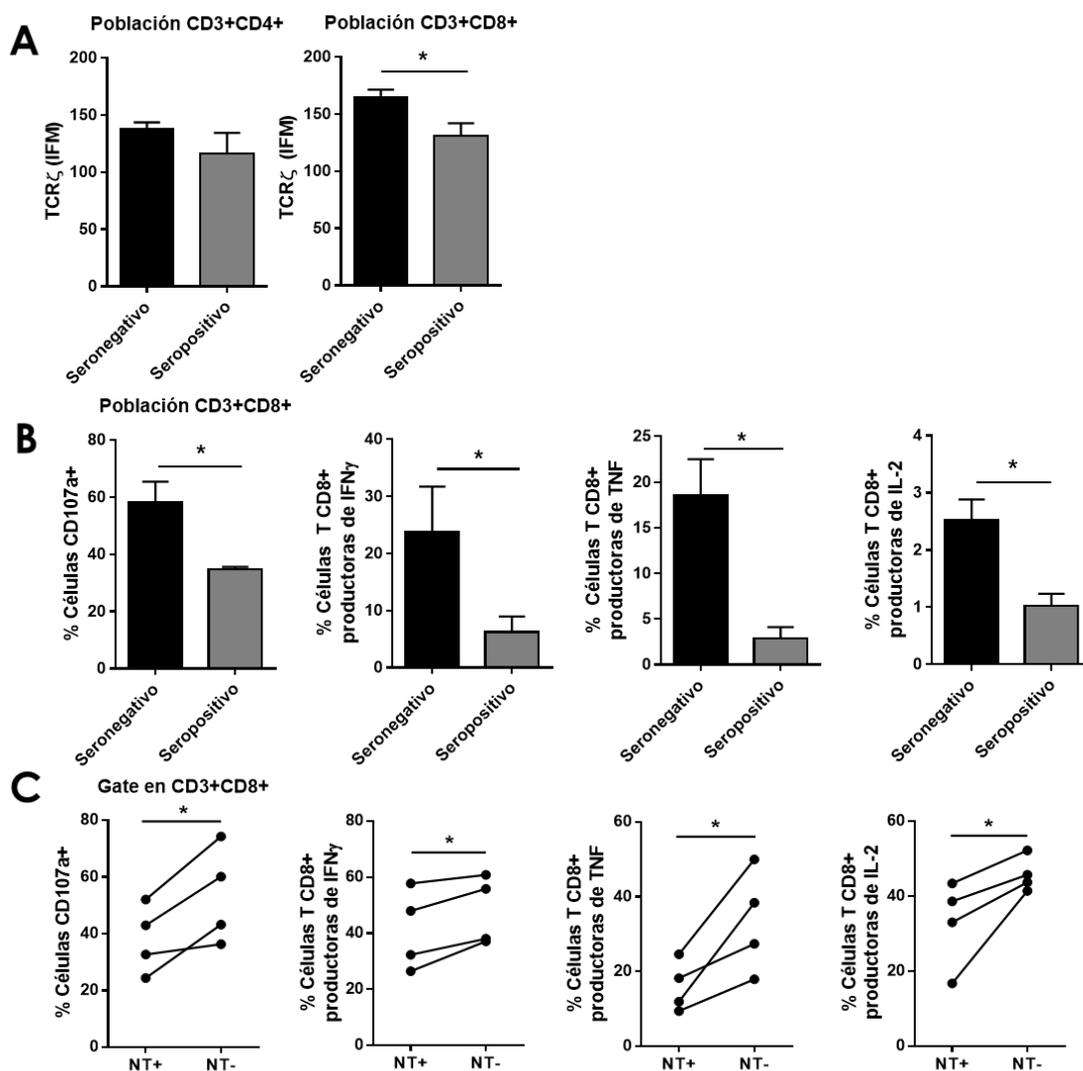
**Figura 6: Los linfocitos T CD8+ de pacientes chagásicos presentan mayor nitración de residuos tirosina.**

(A) Porcentaje de leucocitos, linfocitos y linfocitos T nitrados (NT +) de pacientes seropositivos (n = 6) y seronegativos (n = 6). Dot blots representativos de la expresión de NT en linfocitos T CD8+ de donantes no chagásicos (izquierda) y pacientes chagásicos (derecha). (B) Porcentaje de linfocitos T CD8+ y CD8- nitrados. (C) Porcentaje e IFM de linfocitos T CD8+ y CD8- NT+ en pacientes chagásicos (n = 5). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001. (D) Frecuencia de células T CD8+ naïve, CM, EM y EMRA NT+ o NT- de pacientes chagásicos (n = 4) (% naïve NT+ vs % naïve NT- p < 0,0001; %EM NT+ vs %EM NT- p < 0,0001).

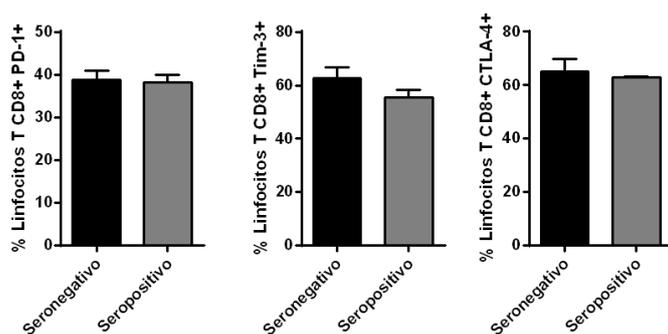
## La nitración conduce a la disfuncionalidad de las células T citotóxicas

La mayor nitración superficial de la población citotóxica indicaba una menor funcionalidad por lo que nos propusimos evaluar la activación celular que presentaban las diferentes subpoblaciones de linfocitos T en pacientes chagásicos. A pesar de que los linfocitos T CD4+ de pacientes seropositivos y seronegativos mostraron niveles similares de expresión de la cadena  $\zeta$  de TCR, las células T citotóxicas mostraron una menor expresión de TCR $\zeta$  en pacientes chagásicos, en comparación con donantes controles (Figura 7A), indicativo de una menor

capacidad de activación. En consonancia con estas observaciones, la población de células T CD8+ de pacientes seropositivos muestra una menor frecuencia de células CD107a+ (marcador de degranulación), así como de células productoras de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 después de la estimulación con PMA/ionomicina (estímulo inespecífico) en comparación con la misma población celular de individuos seronegativos (Figura 7B). Además, después de la activación de células de pacientes chagásicos vía TCR con anti-CD3/anti-CD28, el porcentaje de células T CD8+ CD107a+, y productoras de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 es significativamente menor en células nitradas (NT+) en comparación con células no nitradas (NT-) (Figura 7C). El mismo comportamiento se observa cuando comparamos la funcionalidad de las células T CD8+ nitradas vs no nitradas en las subpoblaciones EM-EMRA (datos no presentados). Estos resultados indican que la nitración se asocia a una menor funcionalidad de las células citotóxicas en pacientes chagásicos. Aunque las células T citotóxicas son menos funcionales, no parecen ser una población clásicamente agotada, ya que la expresión de los receptores inhibitorios que describen el agotamiento (CTLA-4, PD-1 y Tim-3) no presenta incremento en comparación con células T CD8+ de sujetos seronegativos (Figura 8).



**Figura 7: La nitración induce disfuncionalidad de células T citotóxicas de pacientes seropositivos** (A) IFM de TCR  $\zeta$  en linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes seropositivos y seronegativos. (B) Porcentaje de células T CD8+ CD107a+ y productoras de IFN- $\gamma$ , TNF y IL-2 luego del estímulo inespecífico PMA/ionomicina en pacientes chagásicos (n=5) y donantes control (n=5). (C) Frecuencia de linfocitos T CD8+ NT+ y NT- CD107a+, productoras de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 de pacientes seropositivos (n = 4) después de la estimulación con anti-CD3 + anti-CD28. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

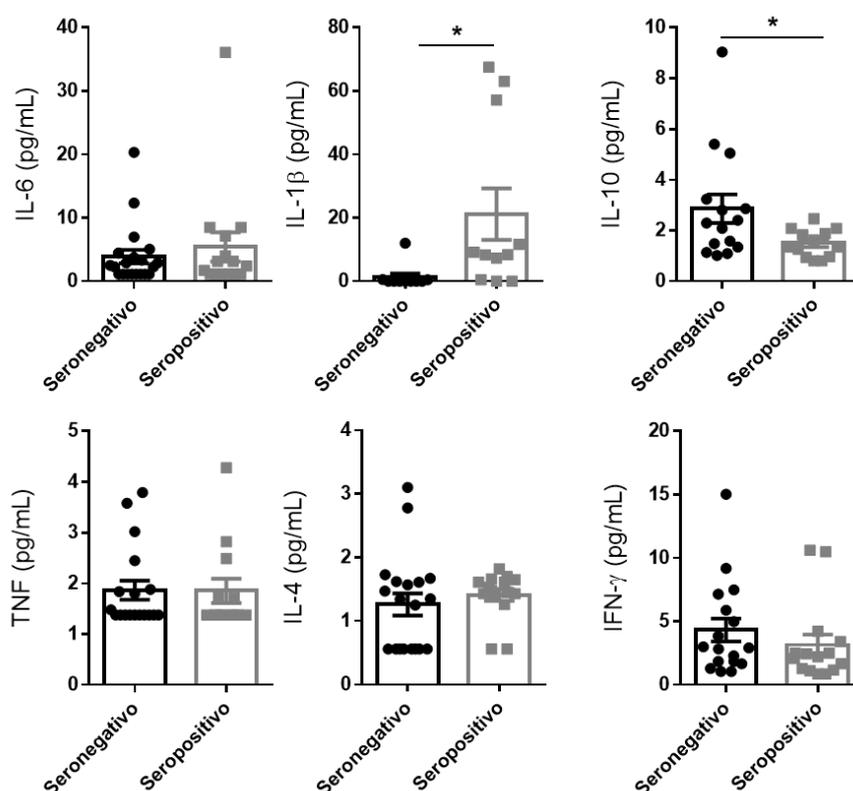


**Figura 8: Las células T CD8+ de pacientes seropositivos no presentan mayor frecuencia de receptores inhibitorios asociados a un fenotipo agotado.**

Frecuencia de PD-1, Tim-3 y CTLA-4 en células CD8+ de pacientes chagásicos (n = 4) y donantes controles (n = 4) después de la estimulación de CMSP con anti-CD3 y anti-CD28 por 72 horas.

## Los pacientes chagásicos presentan incrementados niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$

Los niveles plasmáticos de citoquinas fueron evaluados por citometría de flujo empleando un panel de anticuerpos de captura adheridos a perlas. Si bien no se observan diferencias entre las concentraciones de IL-6, TNF, IL-4 e IFN- $\gamma$ , los niveles de IL-1 $\beta$  fueron mayores y la cantidad de IL-10 fue menor en plasma de sujetos seropositivos comparado con donantes control (Figura 9).



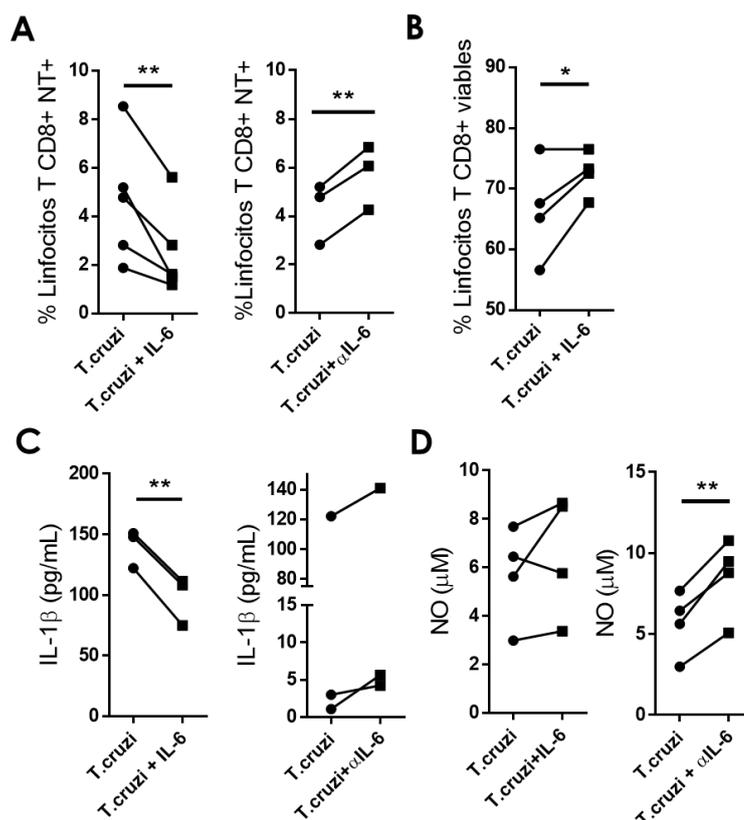
**Figura 9: Los pacientes seropositivos presentan incrementados niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$ .**

Niveles plasmáticos de IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-4 en pacientes seropositivos (n=18) y donantes control (n=15). \* p < 0,05.

## La IL-6 previene la nitración de células T CD8+ y disminuye la producción de IL-1 $\beta$ por CMSP infectadas *in vitro*

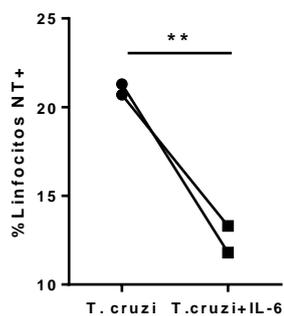
Teniendo en cuenta que habíamos comprobado que IL-6 posee un potente rol anti-oxidante en el contexto de la infección experimental (capítulo II), nos propusimos evaluar si esta citoquina

es capaz de disminuir la nitración inducida por la infección en células T citotóxicas humanas. La estimulación con IL-6 de CMSP de donantes controles infectadas *in vitro* disminuye la NT inducida en células CD3+ CD8+. Por el contrario, el tratamiento de estos cultivos con un anticuerpo bloqueante específico para IL-6 ( $\alpha$ IL-6) aumenta el porcentaje de células NT+ inducido por el parásito (Figura 10A). Además, el tratamiento con IL-6 rescata a las células T CD8+ infectadas de la apoptosis incrementando su sobrevivencia (Figura 10B). Concomitantemente, mientras que la estimulación con IL-6 disminuyó los niveles de IL-1 $\beta$  en sobrenadantes de cultivo de CMSP infectadas, el tratamiento con  $\alpha$ IL-6 aumentó la producción de IL-1 $\beta$  (Figura 10C). Además, aunque la estimulación con IL-6 no afectó los niveles de NO en sobrenadantes de cultivo, su bloqueo aumentó significativamente la producción de NO inducida por *T. cruzi* (Figura 10D). Por otro lado, la estimulación con IL-6 disminuyó la nitración en células CD3+ CD8+ de sangre periférica de pacientes seropositivos infectada (Figura 11).



**Figura 10: La IL-6 previene la nitración de células T CD8+ y disminuye la producción de IL-1β por CMSP infectadas *in vitro*.**

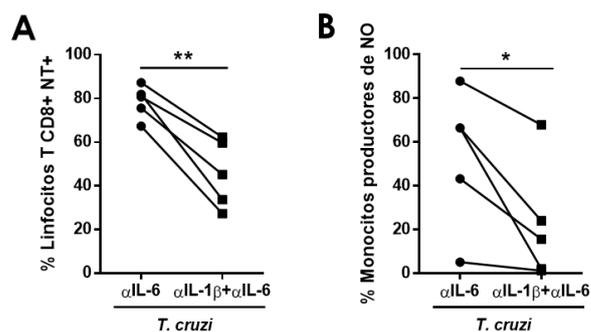
Porcentaje de células CD3+CD8+ (A) NT+ y (B) viables evaluadas por la tinción con Annexina -V y 7AAD estimuladas con *T. cruzi*, *T. cruzi* + IL-6 ó *T. cruzi*+αIL-6. Niveles de (C) IL-1β y (D) NO en sobrenadantes de CMSP de donantes controles estimuladas con *T. cruzi*, *T. cruzi* + IL-6 ó *T. cruzi* + αIL-6 por 48 horas. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.



**Figura 11: La IL-6 previene la nitración de células T CD8+ de pacientes chagásicos.**

Porcentaje de células CD3+ CD8+ NT+ en sangre periférica de pacientes chagásicos (n = 2) cultivada con *T. cruzi* o *T. cruzi*+IL-6 por 24 horas. \*\* p < 0,01.

Corroborando nuestras observaciones en modelos experimentales el bloqueo conjunto de IL-6 e IL-1β disminuyó significativamente el porcentaje de células T CD8+ nitradas en comparación con cultivos incubados sólo con anti-IL-6 (Figura 12A), paralelamente el porcentaje de monocitos productores de NO disminuyó significativamente cuando ambas citoquinas fueron bloqueadas comparadas con la inhibición de IL-6 solamente (Figura 12B).



**Figura 12: El bloqueo de IL-6 e IL-1 $\beta$  revierte el fenotipo inducido por anti-IL-6.**

**(A)** Porcentaje de células T CD8+ NT+ y **(B)** frecuencia de monocitos (CD14+) productores de NO en CMSP infectadas in vitro de sujetos seronegativos (n = 5) después de 48 horas de estimulación con anti-IL-6 o anti-IL-6 + anti-IL-1 $\beta$ . \* p < 0,05 y \*\* p < 0,01.

Estos estudios claramente demuestran que la inhibición de IL-1 $\beta$  ejercida por IL-6 es capaz de frenar el daño molecular causado por el gran estrés oxidativo generado en la enfermedad de Chagas crónica, evidenciando un mecanismo clave para frenar la disfunción de células determinantes en la respuesta frente al *Trypanosoma cruzi*.

### **Conclusiones parciales del Capítulo IV**

- Los pacientes chagásicos presentan un menor número de linfocitos T CD8+ en sangre periférica
  - Los linfocitos T CD8+ de pacientes seropositivos presentan mayor muerte celular y menor expresión de la molécula anti-apoptótica Bcl-2, principalmente en la población de células vírgenes/naïve
  - Los pacientes seropositivos presentan una mayor frecuencia de leucocitos productores de óxido nítrico, causando mayor nitración en sus células, principalmente a nivel de las células T CD8+
  - La nitración induce disfuncionalidad de los linfocitos T CD8+, pero no induce agotamiento celular
  - Los pacientes seropositivos presentan mayores niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$ , pero menores de IL-10
  - La IL-6 ejerce su efecto anti-oxidante al disminuir la producción IL-1 $\beta$  y de NO y frena la nitración inducida por la infección

## **Capítulo V:**

Los monocitos de los pacientes chagásicos presentan un fenotipo inflamatorio y mayor activación de las vías de respuesta a hipoxia

Durante la fase aguda de la infección los parásitos se replican en diferentes tejidos del organismo, mostrando un fuerte tropismo por el miocardio. La respuesta inmune innata y adaptativa controlan los niveles de parásito pero son insuficientes para eliminar completamente la infección y la mayoría de los individuos permanecen infectados de por vida (pacientes crónicos asintomáticos). La persistencia del parásito en el miocardio es central para la patogénesis de la cardiomiopatía<sup>19,21,131</sup>. Debido a que los mecanismos por los cuales la respuesta inmune protectora de los monocitos/macrófagos falla en eliminar el parásito aún no se han establecidos, nos propusimos los siguientes objetivos.

### **Objetivos**

**General:** Caracterizar las subpoblaciones de monocitos de pacientes chagásicos crónicos, evaluando la expresión de genes asociados a hipoxia.

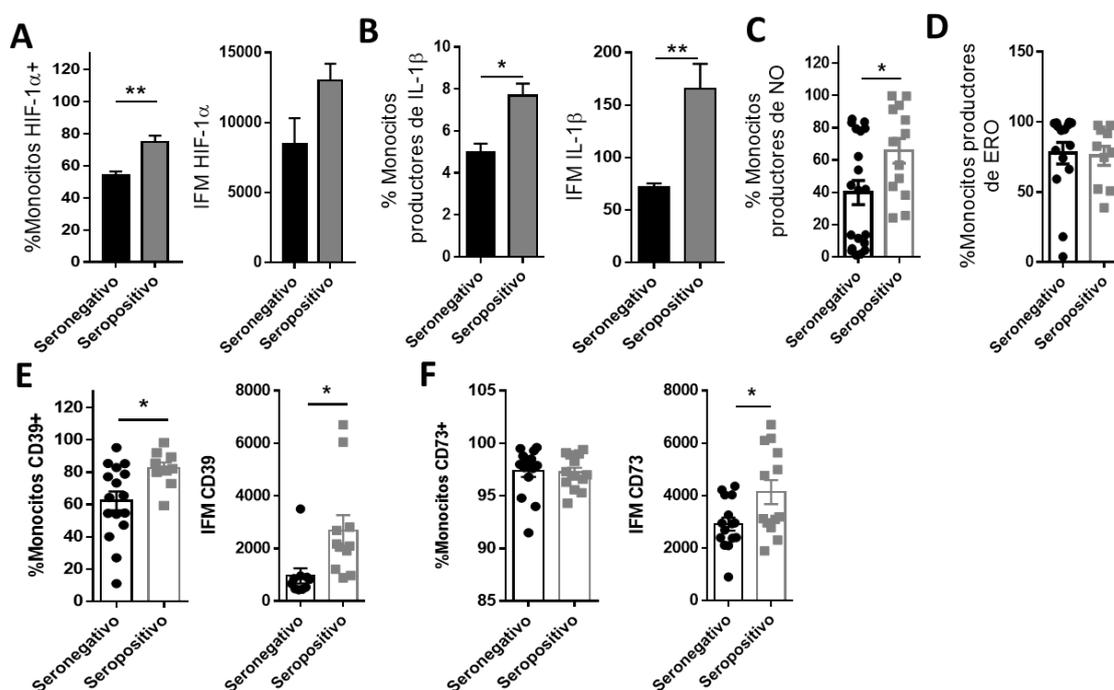
#### **Específicos:**

1. Evaluar la expresión de moléculas reguladas por el factor inducido por hipoxia (HIF) en monocitos de pacientes chagásicos.
2. Determinar el efecto de la infección de monocitos *in vitro* en el metabolismo de la glucosa. Correlacionar el estado de activación metabólica de las células con la producción de mediadores inflamatorios.
3. Definir y caracterizar las subpoblaciones de monocitos de pacientes chagásicos.
4. Evaluar correlación entre el fenotipo de monocitos y la activación de vías glucolíticas.

## Los monocitos de pacientes seropositivos presentan mayor expresión de genes inducidos por HIF

Teniendo en cuenta que reportes recientes indican que tanto citoquinas como agentes infecciosos regulan a nivel transcripcional a HIF, nos propusimos evaluar si la infección con *Trypanosoma cruzi* modulaba la expresión de dicho factor. Observamos mayor frecuencia de expresión de HIF-1 $\alpha$  en monocitos de pacientes chagásicos (Figura 1A), con mayor producción de IL-1 $\beta$  (Figura 1B). Además, se evidenció una mayor frecuencia de monocitos productores de NO (Figura 1C), sin diferencia en la producción de ERO (Figura 1D) entre las células de ambos grupos de pacientes. Estos resultados sugieren que la producción de NO estaría relacionada a la expresión de HIF, y representaría uno de los mecanismos claves para la respuesta inmune anti-parasitaria.

Los monocitos de pacientes chagásicos presentarían mayor capacidad de degradar ATP a ADO, ya que presentan mayor expresión de su maquinaria metabólica, CD39 y CD73 (Figura 1E y F), lo que ejercería un freno a la respuesta inflamatoria inducida por HIF.



**Figura 1: Los monocitos de pacientes seropositivos presentan mayor expresión de genes inducidos por HIF.**

(A) Expresión de HIF-1 $\alpha$  y (B) producción de IL-1 $\beta$  en monocitos de pacientes seropositivos (n=4) y donantes controles (n=4). Frecuencia de monocitos productores de (C) NO y (D) ERO, porcentaje e IFM de monocitos CD39+ (E) y CD73+ (F) en sangre periférica de pacientes seropositivos (n=14) y donantes seronegativos (n=21). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

## **La infección in vitro con *Trypanosoma cruzi* induce cambios glucolíticos en monocitos**

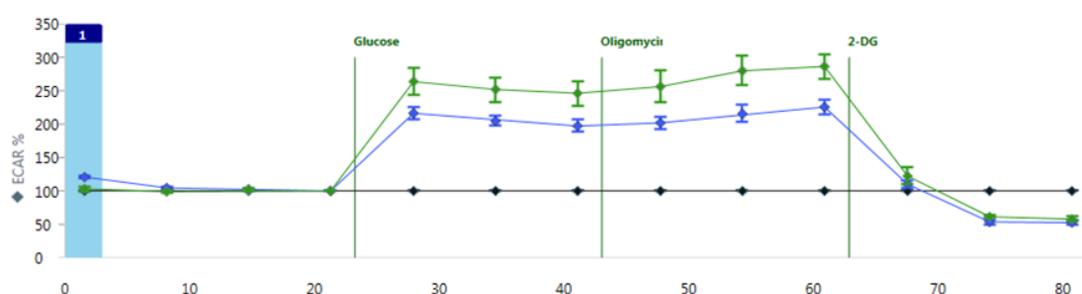
Con el objetivo de evaluar la vía metabólica activada durante la infección con *Trypanosoma cruzi*, se infectaron monocitos humanos de un donante seronegativo por 24 horas o se mantuvieron en medio de cultivo como control. Para la medición de tasa de acidificación extracelular (ECAR) primero los monocitos se mantuvieron en estrés con medio sin glucosa ni piruvato por 1 hora a 37°C. Luego se le realizaron los siguientes estímulos sucesivos:

1. Condición saturante de glucosa: las células utilizan este metabolito y lo catabolizan a través de la vía glucolítica produciendo ATP, NADH, agua y protones. Estos protones inducen un incremento en ECAR.

2. Oligomicina: un inhibidor de la ATP sintasa (complejo V) mitocondrial, que dirige toda la producción de energía a la glucólisis con el subsecuente incremento en ECAR revelando la máxima capacidad glucolítica celular.

3. 2-deoxiglucosa (2-DG): un análogo de glucosa que inhibe la glucólisis por unión competitiva a glucosa hexokinasa, la primera enzima de la vía glucolítica. El agregado de 2-DG resulta en una disminución en ECAR y confirma que la medición de este parámetro se debe a glucolisis.

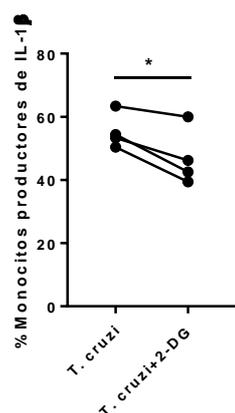
La medición de ECAR previo al agregado de glucosa se asocia a acidificación no glucolítica. La medición de ECAR se realizó utilizando el equipo Seahorse y observamos que la infección induce un incremento en la glucólisis evaluada por la producción de protones (Figura 2). En base al resultado preliminar obtenido podemos observar que la infección de monocitos con *T. cruzi* genera activación glucolítica evidenciada por un incremento en ECAR (Figura 2).



**Figura 2:** Diagrama del porcentaje relativo de producción de protones (ECAR) en monocitos de un donante control infectados con *Trypanosoma cruzi* in vitro (relación 1:1) (línea verde) o mantenidos en medio (línea celeste). Cada línea representa el promedio de la corrida por triplicado de cada condición a lo largo del tiempo, luego del agregado de cada uno de los estímulos descritos en el texto: glucosa, oligomicina y 2-DG.

## La glucólisis es crucial para inducir un perfil inflamatorio de monocitos

Con el objetivo de estudiar si la glucólisis media los mecanismos que utilizan los monocitos para responder a la infección y ejecutar funciones microbicidas, evaluamos la producción de mediadores pro- y anti-inflamatorios en células mononucleares obtenidas de sangre periférica de individuos seronegativos pre-tratadas con el inhibidor de glucólisis 2-DG y luego infectadas o solo infectadas. Se evidenció que la frecuencia de monocitos (CD14+) productores de IL-1 $\beta$  disminuye cuando las células presentan inhibición de la vía glucolítica (Figura 3).



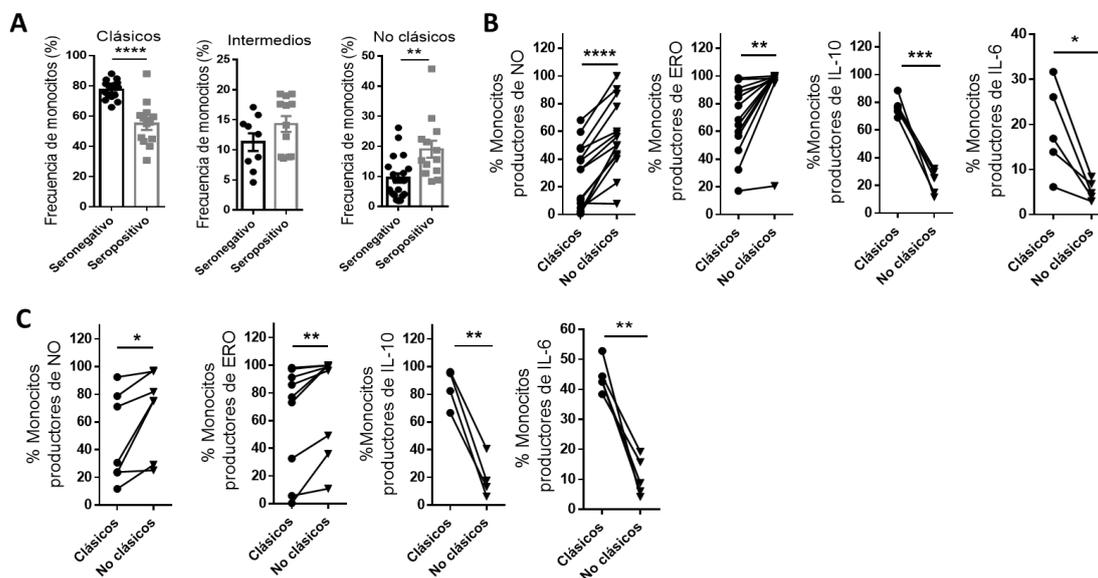
**Figura 3: El tratamiento con inhibidor de la glucólisis disminuye la producción de IL-1 $\beta$ .**

Frecuencia de monocitos de individuos seronegativos productores de IL-1 $\beta$  luego de la infección con *Trypanosoma cruzi* o con pretratamiento con 2-DG y luego infección con *Trypanosoma cruzi*.

## Los monocitos de pacientes chagásicos presentan un fenotipo no clásico con funciones inflamatorias

Considerando que los monocitos de pacientes seropositivos presentaron mayor producción de mediadores inflamatorios, nos propusimos evaluar la frecuencia y funcionalidad de las diferentes subpoblaciones circulantes. Observamos que la frecuencia de monocitos con un fenotipo clásico fue significativamente menor en individuos seropositivos que en individuos controles, por el contrario los monocitos con fenotipo no clásico mostraban mayor porcentaje mientras que no se evidenciaban diferencias entre los de la subpoblación intermedia (Figura 4A). Considerando las controversias que existen en la literatura en cuanto a la funcionalidad de las diferentes subpoblaciones de monocitos, cuantificamos la tasa de producción de ERO, NO, IL-6 e IL-10 en el subset clásico y en el no clásico. Encontramos que tanto en donantes controles y chagásicos los monocitos no clásicos presentan una mayor producción de ERO y de NO (Figura 4B y C). Paralelamente, la frecuencia de producción de IL-10 e IL-6 fue menor en el subset de monocitos no clásicos en ambos grupos de individuos (Figura 4B y C). Esto nos llevó a concluir

que en su conjunto la población de monocitos no clásicos presentaba un perfil preponderantemente inflamatorio.



**Figura 4: Los pacientes seropositivos presentan un incremento de monocitos inflamatorios.**

**(A)** Porcentaje de monocitos clásicos (CD14++CD16-), intermedios (CD14++CD16+) y no clásicos (CD14+CD16++) en sangre periférica de pacientes chagásicos (n=13) y donantes no chagásicos (n=20).

**(B)** Frecuencia de monocitos clásicos y no clásicos productores de NO, ERO IL-10 e IL-6 en sangre periférica de donantes seronegativos (n=21) y **(C)** pacientes seropositivos (n=10). \* p < 0,05 \*\* p < 0,01 \*\*\* p < 0,001 y \*\*\*\* p < 0,0001.

Estos resultados nos permiten concluir que los monocitos de pacientes chagásicos presentan un estado inflamatorio activado, y utilizarían mecanismos glucolíticos para llevar a cabo su función efectora.

### **Conclusiones parciales del Capítulo V**

- Los monocitos de pacientes chagásicos crónicos sin sintomatología cardíaca presentan mayor expresión de genes inducidos por HIF que los donantes controles.
- La infección *in vitro* con *Trypanosoma cruzi* induce cambios glucolíticos en monocitos.
- La inducción de glucólisis es crucial para determinar el perfil inflamatorio de monocitos infectados.
- Los monocitos de pacientes chagásicos presentan preponderantemente un fenotipo no clásico con funciones inflamatorias

## **Capítulo VI:**

Discusión

En la presente tesis doctoral estudiamos la participación de IL-6 en la respuesta inmune innata cardíaca contra *Trypanosoma cruzi* (Capítulo II) y en el efecto del estrés oxidativo tóxico inducido por la infección en diferentes células, tejidos y sistemas (Capítulo III y IV). Además, evaluamos el estado de activación de monocitos en pacientes con enfermedad crónica, considerando que estas células representan una de las principales fuentes de especies oxidantes (Capítulo V). En conjunto nuestros resultados demuestran cómo IL-6 controla el aumento del estrés oxidativo generado en el marco de la infección, mejorando la supervivencia y funcionalidad de diferentes poblaciones celulares.

Aunque la principal característica del sistema inmune innato es reconocer y proteger al huésped de agentes infecciosos, numerosos reportes han descrito que puede participar en otras funciones en mamíferos. En este sentido, el sistema inmune local del corazón puede hacer más que simplemente orquestar la respuesta inmune, ya que también delimita la lesión tisular y coordina las respuestas homeostáticas dentro del tejido cardíaco<sup>132,133</sup>. Resultados previos de nuestro grupo demuestran que la infección de cultivos primarios de cardiomiocitos con *Trypanosoma cruzi* induce selectivamente la producción de IL-6<sup>48</sup>, evidenciando que dicha citoquina lleva a cabo un rol clave en la respuesta cardíaca intrínseca durante la infección.

Interleuquina-6 es una citoquina pleiotrópica con reportada actividad inflamatoria que participa en diferentes funciones fisiológicas, incluyendo proliferación, supervivencia y disminución de la apoptosis<sup>134-139</sup>. A pesar de que numerosos trabajos han estudiado a la familia de citoquinas de IL-6<sup>140</sup>, las funciones fisiológicas de esta citoquina en el corazón durante una situación de estrés aún no están totalmente dilucidadas. Sin embargo, IL-6 presenta funciones que son consistentes con la recuperación funcional del tejido cardíaco post-estrés. Sorprendentemente, IL-6 ejerce potentes efectos anti-apoptóticos proporcionando una protección completa a los cardiomiocitos neonatales de rata en un modelo de muerte celular inducido por esfingosina<sup>75</sup>. Asimismo, se ha demostrado que la administración *in vivo* de IL-6 logra revertir completamente la disfunción cardíaca y la apoptosis de cardiomiocitos inducida por un modelo experimental de colapso circulatorio hipovolémico<sup>141</sup>. La liberación de IL-6 en respuesta a la infección parasitaria es capaz de inducir la fosforilación de STAT-3 en cultivos de cardiomiocitos, mediador de la supervivencia celular<sup>74,139,142,143</sup>. En este sentido, se ha demostrado que la fosforilación de STAT3 se encuentra involucrada en la citoprotección de las células cardíacas en un modelo de miocarditis viral<sup>144</sup> y en infarto agudo de miocardio<sup>145</sup>. En el contexto de infección con *T. cruzi*, la producción y liberación de factores de supervivencia tales como la citoquina pleiotrópica IL-6 podrían servir para bloquear la apoptosis en las células cardíacas

mientras transcurre la respuesta inmune inflamatoria anti-parasitaria, y así las mantiene con vida en un entorno muy desfavorable <sup>48</sup>.

El rol quimiotáctico de IL-6 ha sido estudiado en diferentes contextos; en un modelo de injuria de músculo esquelético se correlacionó el incremento en el reclutamiento de monocitos/macrófagos con el pico de producción de dicha citoquina. Además, se reportó que los animales deficientes en IL-6 presentaban menor producción de MCP-1/CCL2 y de CCL3, teniendo como consecuencia menor infiltrado de macrófagos en músculo <sup>146</sup>. En línea con esto, en un modelo de reparación tisular de epidermis los animales deficientes en IL-6 presentaron reducida expresión de quemoquinas (CCL3, CCL4), moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1) y menor infiltrado de macrófagos <sup>147</sup>. Por otro lado, mientras que en la infección con el virus de coxsackie B3 (CVB3) se observó un incremento en los niveles séricos de MCP-1 y mayor reclutamiento de monocitos/macrófagos a tejido cardíaco IL6KO, el tratamiento con IL-6 en estos animales incrementó la llegada de diferentes tipos celulares a corazón <sup>148</sup>. En línea con resultados publicados por nuestro grupo indicando que IL-6 induce el influjo de células supresoras mieloides durante la infección <sup>78</sup>, nosotros observamos que además dicha citoquina es necesaria para la migración de leucocitos, particularmente macrófagos, al corazón infectado, independientemente de la fuente celular de IL-6.

El papel de IL-6 en la respuesta a injuria cardíaca ha sido ampliamente estudiado. Su función cardioprotectiva fue reportada en miocarditis viral por infección con CVB3, donde se observó que animales IL6KO presentan mayor severidad de la patología en la fase crónica, que mejora al tratar los animales con IL-6 <sup>148</sup>. Además el tratamiento con IL-6 durante la infección con el virus de encefalomiocarditis (EMCV) resulta en disminución de la patología cardíaca autoinmune y un incrementado reclutamiento de macrófagos <sup>149</sup>. Sin embargo, la infección con EMCV en ratones que sobre-expresan IL-6 conlleva a una mayor severidad de la enfermedad <sup>150</sup>. Además, en diferentes modelos de injuria cardíaca estéril, como isquemia-reperfusión e infarto de miocardio se describió un incremento en la producción de IL-6 por los cardiomiocitos <sup>151-153,154,155</sup>. Particularmente ocurre una mayor producción de dicha citoquina en la zona de infarto, sugiriendo que el efecto combinado de la IL-6 frenando la apoptosis y disminuyendo la hipertrofia podría llevar a preservar el borde de la zona cardíaca infartada <sup>153</sup>. Sin embargo, niveles elevados sostenidos en el tiempo pueden ser perjudiciales, ya que al inducir un programa anti-apoptótico y reducir la contractilidad a largo plazo, la función muscular del tejido es menos efectiva y comienza a hipertrofiarse, llevando a falla cardíaca. En concordancia, durante el desarrollo de esta tesis observamos que la IL-6 es clave para la supervivencia de los animales infectados con *Trypanosoma cruzi*, ya que los deficientes presentaron un 100% de mortalidad al

día 22 post-infección, evidenciando mayor daño y muerte celular a nivel cardíaco. Estos resultados confirman que IL-6 funciona como regulador en un delicado balance dependiendo del contexto evaluado.

A pesar de la reconocida actividad inflamatoria de IL-6, aquí describimos que durante la enfermedad de Chagas dicha citoquina es clave para la activación alternativa de macrófagos cardíacos, ya que a diferencia de los animales WT, los IL6KO no desarrollan un perfil M2 predominante a lo largo de la cinética de infección. Estos resultados fueron corroborados *in vitro*, donde el tratamiento con IL-6 fue capaz de disminuir el porcentaje de macrófagos clásicamente activados, incrementando los niveles de IL-4 (inductora del perfil M2) en sobrenadante de cultivo. En línea con estos resultados Xing *et al* revelaron que la producción endógena de IL-6 lleva a cabo un papel anti-inflamatorio crucial a nivel local y sistémico controlando los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, pero no aquellas anti-inflamatorias. Esta actividad llevada a cabo por IL-6 no puede ser compensada por IL-10 ni por otros miembros de la familia de IL-6<sup>156</sup>. Particularmente se describió la capacidad de IL-6 de modificar el fenotipo de macrófagos humanos incrementando la expresión del receptor de manosa (CD206)<sup>157</sup> y la producción de IL-4 e IL-10, disminuyendo los niveles de IL-1 $\beta$ <sup>158</sup>. Además se evidenció que IL-6 es determinante en la activación alternativa de macrófagos en un modelo de endotoxemia o al alimentarlos con dieta con alto contenido de grasa. Estos animales incapaces de activar sus células mieloides por IL-6 (no expresan el receptor  $\alpha$  de IL-6 en células mieloides) son más propensos a desarrollar obesidad e intolerancia a la glucosa y presentan mayor expresión de marcadores M1 y menor expresión de marcadores M2 en macrófagos de tejido adiposo que su contraparte control. Los macrófagos M1 pro-inflamatorios son mediadores centrales en la obesidad inducida por inflamación y en la insulinoresistencia<sup>159</sup>. Por el contrario la eliminación de genes que promueven la activación alternativa de macrófagos predisponen al desarrollo de intolerancia a la glucosa y de resistencia a la insulina<sup>160</sup>. Por lo tanto, los macrófagos M2 son críticos para el control metabólico mientras que el incremento de macrófagos M1 lleva a una disrupción en la homeostasis de glucosa<sup>57</sup>.

IL-6 es capaz de afectar directamente el metabolismo de lípidos y activa diferentes vías para promover un cambio en la utilización de la energía; estimula la lipólisis en humanos, incrementa las concentraciones de ácidos grasos y su oxidación<sup>161</sup>. Sin embargo, el rol de IL-6 tanto en obesidad como en insulinoresistencia es controversial. Mientras numerosos estudios indican que el incremento en los niveles de IL-6 se correlaciona con adiposidad y aumento del tejido graso y no necesariamente con la acción o falta de respuesta a la insulina<sup>162,163</sup>, otro estudio muestra incremento en los niveles de IL-6 en pacientes con insulinoresistencia asociada a

obesidad<sup>164</sup>. Por otro lado, se describió que IL-6 incrementa la resistencia a la insulina en hígado y TAV al incrementar SOCS3 (supresor de la señalización de citoquinas 3)<sup>165</sup>. Por lo que IL-6 tendría una función dual, dependiendo del tejido y del estado metabólico del huésped. Durante el ejercicio, IL-6 aumenta la captación de glucosa en músculo esquelético, llevando a hipertrofia muscular, miogénesis y oxidación de ácidos grasos<sup>166</sup>. Considerando los antecedentes, el aumento de estrés oxidativo producto de monocitos/macrófagos inflamatorios en animales deficientes en IL-6 causaría en estos animales desórdenes metabólicos que incluirían resistencia a la insulina, presentando consecuencias a nivel de múltiples órganos. En este sentido, es importante tener en cuenta que los mecanismos inducidos por IL-6 descritos hace décadas, ahora dan luz a cómo esta citoquina es capaz de modular el perfil de activación de diferentes células inmunes.

Los macrófagos son capaces de coordinar finamente sus programas metabólicos para ajustarse a las necesidades inmunológicas y bioenergéticas. Cuando se enfrenta a un microorganismo, su potencial bioenergético rápidamente cambia para montar una respuesta robusta que resuelva el desafío inmunológico. La activación clásica es una respuesta rápida que actúa frente a patógenos que proliferan intracelularmente, produciendo especies reactivas y citoquinas pro-inflamatorias. Luego de la activación de macrófagos con LPS o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), la producción de NO lleva al colapso mitocondrial (resultando en una disminuida producción de ATP). El NO inhibe la respiración mitocondrial nitrando proteínas que incluyen el complejo I, II y IV de la cadena transportadora de electrones, inhibiendo el transporte de electrones y subsecuentemente la producción intracelular de ATP. Una de las principales consecuencias es la generación de ERO mitocondrial. Es importante destacar que los macrófagos clásicamente activados requieren tanto de glucólisis como de la actividad del complejo I para generar una respuesta inmune apropiada, por lo tanto la inhibición de ambas afecta la producción de IL-1 $\beta$ <sup>120</sup>. Los eventos metabólicos llevados a cabo en la mitocondria modifican la activación inmune. La principal función de la mitocondria es generar ATP a través de la OXPHOS. Esta vía que involucra múltiples pasos lleva a la generación de 32 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa y es llevada a cabo por células en estado de reposo. La glucólisis, que convierte glucosa en piruvato y luego en lactato, ocurre durante la hipoxia, generando ATP de forma más rápida que la OXPHOS, pero menos eficiente (2 moléculas). Ambos mecanismos tienen un efecto tanto en la respuesta inmune como en la función cardíaca, por lo que el estudio de las vías activadas durante la infección resultaría clave para el conocimiento y posible terapéutica de la cardiopatía chagásica. En línea con esto, una activación de la vía glucolítica (evidenciada a través de ECAR) en monocitos humanos infectados,

se podría asociar a una mayor respuesta inflamatoria de dichas células y a la mayor producción de metabolitos microbicidas, pero en altos niveles tóxicos como IL-1 $\beta$  y NO.

La correcta funcionalidad de tejido cardíaco depende de adecuados niveles energéticos, ya que se contrae incesantemente para garantizar el flujo sanguíneo y los niveles adecuados de oxígeno a todos los órganos. Para cumplir esta alta demanda energética el corazón utiliza diferentes sustratos para producir ATP, condición importante en situaciones de estrés agudo o crónico. El cambio en la preferencia de sustratos puede ser beneficioso en una respuesta inmediata para mantener el suministro de energía, sin embargo puede ser perjudicial en una respuesta a largo plazo.

Durante la infección, el influjo de células inmunes consume gran cantidad de oxígeno y las células isquémicas responden rápidamente al ambiente inflamatorio e hipóxico liberando ATP<sup>125,167</sup>. Una vez liberado, el ATP es degradado a AMP y luego a ADO a través de la acción de CD39 y CD73 respectivamente. Nuestro grupo reportó recientemente que es posible modificar el perfil de activación de los macrófagos cardíacos al modular la degradación de ATP extracelular, por la inhibición temporaria de CD73, mejorando la función cardíaca en la fase crónica de la infección<sup>90</sup>. En el desarrollo de la presente tesis observamos que IL-6 incrementa la expresión de la maquinaria metabólica de ATP en células murinas y humanas. Es importante destacar que ATP activa en monocitos/macrófagos el ensamble del inflamosoma que procesa pro-IL-1 $\beta$  a IL-1 $\beta$ <sup>168</sup>. En este sentido, como consecuencia de la menor capacidad de degradar ATP, la deficiencia de IL-6 induciría acumulación de este, lo que llevaría a la activación del inflamosoma y a la producción de IL-1 $\beta$ . Coincidentemente, identificamos en animales IL6KO un incremento sostenido en los niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$ , concomitantemente con altos niveles de NO plasmáticos y cardíacos en comparación con su contraparte control. Es importante remarcar que tanto IL-1 $\beta$  como NO son sustancias altamente microbicidas, pero con reportada actividad citotóxica en células de diferentes órganos, como cardiomiocitos, células  $\beta$  pancreáticas, y diferentes tipos de células de parénquima renal. Nuestros resultados confirman que la deficiencia de IL-6 presenta consecuencias locales a nivel cardíaco evidenciado a través de la activación clásica de los macrófagos y sistémicos, ya que a lo largo de la cinética predominan en circulación los monocitos inflamatorios e incluso se observa un incremento en la producción de especies oxidantes en tejido adiposo.

Apoyando nuestros resultados que proponen que IL-6 lleva a cabo un rol crítico en la regulación negativa del NO, ha sido reportado que el tratamiento de macrófagos peritoneales con IL-6 frena la producción de nitritos inducida por IFN- $\gamma$ <sup>169</sup>, y que esta citoquina es capaz de

disminuir la frecuencia de BMDM que expresan iNOS en respuesta al tratamiento con LPS<sup>57</sup>. En conjunto, el incremento de células con actividad microbicida y la gran producción de NO conllevan a una disminuida parasitemia y carga parasitaria cardíaca en animales deficientes. En acuerdo con un reporte previo<sup>79</sup> no detectamos cambios en los niveles plasmáticos y cardíacos de IFN- $\gamma$  en dichos animales infectados, sugiriendo que otro mediador inflamatorio es el responsable de la inducción de niveles descontrolados de NO. Mediante estrategias *in vivo* e *in vitro* demostramos que IL-6 frena la producción de NO, al menos en parte, controlando los niveles de IL-1  $\beta$ . La relevancia biológica de estos mecanismos está claramente ilustrada por el rescate de los animales deficientes infectados cuando son tratados con un inhibidor específico de la producción de NO.

Las especies reactivas presentan roles contrapuestos; mientras llevan a cabo un rol indispensable en múltiples sistemas biológicos como segundos mensajeros, diferenciación celular, apoptosis<sup>170</sup>, y defensa contra microorganismos, el estrés oxidativo contribuye a la disfunción celular. El estrés oxidativo puede ser consecuencia de un incremento en la generación de especies reactivas, una menor función del sistema anti-oxidante o ambos. Si los sistemas anti-oxidantes no son capaces de inactivar las especies reactivas, estas pueden reaccionar con macromoléculas y aumentar procesos de peroxidación lipídica, daño en el ADN y/o modificaciones en proteínas y ácidos nucleicos<sup>171</sup>. Las especies oxidantes inducen oxidación de proteínas (nitricación de tirosinas), lípidos (peroxidación lipídica), oxidación de lipoproteínas de baja densidad (oxLDL), oxidación de ácidos nucleicos (8-oxo-2-deoxi-guanosina). Particularmente los peroxinitritos, son especies nitrogenadas altamente citotóxicas que reaccionan con residuos tirosina produciendo nitrotirosina, una huella estable que puede ser detectada a nivel tisular<sup>172</sup>. Los productos oxidados o nitrados generalmente presentan menor actividad biológica llevando a desregulación metabólica y alteraciones en la señalización celular, entre otras funciones<sup>173</sup> lo que lleva al desarrollo de diferentes patologías incluyendo aterosclerosis<sup>174-176,172,177</sup>.

La nitricación de tirosinas en células citotóxicas ha sido ampliamente estudiada en diferentes modelos tumorales<sup>178-180</sup>, y particularmente nuestro grupo ha reportado un incremento en la nitricación de células T CD4+ y CD8+ esplénicas en animales infectados<sup>78</sup>. Estas células presentan particular importancia en el control de la infección con *Trypanosoma cruzi* ya que al ser un parásito intracelular, sus antígenos son procesados y presentados en el contexto de MHC tipo I a las células CD8+. La NT afecta principalmente al complejo TCR/CD8 impidiendo la interacción con el MHC-péptido<sup>181</sup>. Asimismo, los peroxinitritos inhiben la señalización del TCR, alterando la activación celular. En línea con esto, durante el desarrollo de esta tesis observamos un

incremento en la nitración de residuos tirosina en la población de linfocitos T, particularmente CD8<sup>+</sup> de pacientes con enfermedad de Chagas crónica sin sintomatología clínica. Estas células presentaron menor capacidad de activación, menor producción de citoquinas y menor función citotóxica. En línea con nuestros resultados, se ha reportado que la supresión de la activación inducida por nitración afecta la estabilidad del ARN mensajero de IL-2 y su liberación. Además, regula negativamente la señalización de proteínas directamente, a través de la nitración de residuos tirosina, o indirectamente activando cinasas de proteína <sup>182</sup>.

Teniendo en cuenta que los leucocitos de pacientes seropositivos presentan mayor producción de NO, y este mediador induce apoptosis mediada por Fas-L <sup>183</sup>, es posible explicar que el menor número de células T CD8<sup>+</sup> en pacientes chagásicos se debería a apoptosis espontánea. En concordancia, estas células presentan menor expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, que es capaz de disminuir la susceptibilidad a apoptosis inducida por NO <sup>184</sup>. Fue reportado que los niveles de NO plasmáticos, medidos con el reactivo de Griess no presentan diferencias entre sujetos seropositivos y seronegativos, mientras que si se detecta un incremento en los niveles plasmáticos de NT en los pacientes infectados <sup>185</sup>. Estos resultados indican que los pacientes chagásicos están expuestos crónicamente a un mayor estrés oxidativo. En acuerdo con estos reportes previos no hubo diferencias en los niveles plasmáticos de NO aunque el porcentaje incrementado de células productoras de NO en pacientes seropositivos sugiere que el efecto oxidante es dependiente del contacto célula-célula. Este mecanismo de acción podría ser llevado a cabo por células supresoras mieloides <sup>181,186</sup>.

De acuerdo con los resultados previamente descritos en el modelo animal, mientras observamos incrementados niveles plasmáticos de IL-1 $\beta$  en pacientes chagásicos, la estimulación con IL-6 de CMSP infectadas *in vitro* disminuye la producción de IL-1 $\beta$  en sobrenadante de cultivo. Asimismo, IL-6 disminuye la tasa de nitración y mejora la supervivencia de las células T CD8<sup>+</sup> infectadas. En concordancia nuestro grupo previamente demostró que IL-6 actúa como un factor anti-apoptótico de células infectadas <sup>48,73</sup>. Interesantemente, la incubación con IL-6 de leucocitos de pacientes seropositivos infectados *in vitro* disminuye el porcentaje de células T NT. Teniendo en cuenta todos estos datos, la acción anti-inflamatoria de IL-6 sería central para controlar el estrés oxidativo cardíaco y sistémico, ejerciendo un mecanismo de protección sobre diferentes tipos celulares.

Por otro lado, el potencial rol del estrés oxidativo ha tomado importancia en el desarrollo de desórdenes metabólicos durante los últimos años, proponiéndose como un evento temprano en la patogénesis de enfermedades crónicas, más que una consecuencia o simple coincidencia.

Por ejemplo pacientes con estos desórdenes presentan elevado daño oxidativo evidenciado por disminución en la protección anti-oxidante (menores niveles de vitamina C y  $\alpha$ -tocoferol, menor actividad de superóxido dismutasa) y mayor peroxidación lipídica (niveles de malondialdehído)<sup>187</sup>. En línea con esto Holvoet *et al.*<sup>188</sup> evidenció que individuos adultos con elevados niveles de oxLDL presentaron mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico. Aquellos individuos con desórdenes metabólicos presentan mayor riesgo de desarrollar enfermedades coronarias y presentan mayor tasa de mortalidad a pesar de no presentar enfermedades cardiovasculares o diabetes<sup>189-193</sup>. Se ha reportado que los niveles de marcadores de estrés oxidativo como 8-iso-PGF2 $\alpha$ <sup>194</sup>, nitrotirosina<sup>172</sup>, oxLDL<sup>195</sup> y mieloperoxidasa<sup>196</sup> son predictores independientes de riesgo temprano de desarrollar enfermedad cardiovascular e infarto de miocardio.

Teniendo en cuenta que en individuos diabéticos se ha asociado la oxidación de lípidos, proteínas y/o ADN con los niveles de glucemia<sup>197,198</sup> podemos sugerir que la incapacidad de los animales deficientes en IL-6 para regular los niveles plasmáticos de glucosa puede deberse al estrés oxidativo sistémico que presentan. La regulación glucosa-estrés oxidativo sería bidireccional ya que varios estudios demuestran que la incubación de diferentes tipos celulares con glucosa induce estrés oxidativo<sup>199,200</sup>, además individuos diabéticos presentan mayor susceptibilidad a oxidación de LDL<sup>201</sup> y más 8-oxodG en células mononucleares<sup>202</sup>. Se propone entonces, que el estrés oxidativo contribuiría a la resistencia a la insulina<sup>203,204</sup>, este estado se caracteriza por disturbios en el metabolismo de ácidos grasos y está acompañado de acumulación de triglicéridos. Consistentemente con esta idea, se ha observado un incremento de peroxidación lipídica en músculo esquelético de individuos obesos con insulinoresistencia<sup>205</sup>. Adicionalmente, el TAV –principal órgano sensor de insulinoresistencia- incrementa la producción de citoquinas inflamatorias, que pueden inducir estrés oxidativo y reduce la respuesta a glucosa en músculo<sup>203</sup>. En línea con esto, es posible sugerir que el rol anti-oxidante de IL-6 mejoraría la sensibilidad a la insulina de células claves en el desarrollo de patologías metabólicas como los macrófagos.

Considerando que el bloqueo de IL-6 ha demostrado éxito, pero también fallas terapéuticas es imperioso conocer y comprender los múltiples efectos llevados a cabo por IL-6 para evitar efectos adversos o falla en las terapias llevadas a cabo en pacientes con enfermedades inflamatorias. Como resultado de esta tesis podemos concluir que IL-6 ejerce un rol vital anti-oxidante clave para la supervivencia de diferentes tipos celulares involucrados tanto en la respuesta inmune como en la funcionalidad de distintos órganos. Por lo que bloquear la actividad de IL-6 representaría un riesgo por la toxicidad generada como consecuencia del potencial estrés oxidativo.

**Perspectivas:**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis evidencian nuevas funciones aún no descritas de IL-6. El efecto anti-oxidante llevado a cabo por esta citoquina a nivel sistémico y sobre diferentes tipos celulares claves para la respuesta inmune resulta vital para la supervivencia del huésped.

Por otro lado, considerando que la infección en general y el *Trypanosoma cruzi* en particular, induce estrés oxidativo, la nitración representa un claro mecanismo de evasión para frenar la respuesta citotóxica anti-parasitaria. Por ello IL-6 lleva a cabo un efecto protector tanto en la supervivencia como funcionalidad de las células inmunes que participan en la defensa contra microorganismos.

Como perspectivas, ya que reportamos la capacidad de IL-6 de frenar la activación inflamatoria de macrófagos, evaluar el rol de esta citoquina en la modulación de la captación de glucosa y la activación de vías metabólicas sería clave para dilucidar el mecanismo por el cual IL-6 participa en la inhibición de la producción de IL-1 $\beta$ .

Teniendo en cuenta que resultados preliminares nos permiten observar que la infección *in vitro* induce una modificación en la actividad glucolítica de monocitos; estudiar si la glucólisis es uno de los mecanismos involucrados en la mayor respuesta inflamatoria de monocitos en pacientes chagásicos sería un paso clave para comprender y plantear estrategias terapéuticas para esta y otras patologías.

## **Capítulo VII**

### **Materiales y métodos**

## **Parte I: Modelo Animal**

### **Animales**

Ratones C57BL/6 fueron adquiridos en la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Los ratones B6.129S2-Il6<sup>tm1Klop/J</sup> deficientes en IL-6 y los deficientes en el receptor NLRP3 (B6.129S6-Nlrp3<sup>tm1Bhk/J</sup>) y en CD73 (CD73KOB6.129S1-Nt5e<sup>tm1Lft/J</sup>) fueron adquiridos de *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Estados Unidos). Los animales se mantuvieron en el Bioterio del Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET (número de aprobación del National Institutes of Health-USA: A5802-01) siguiendo las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación publicado por el Consejo Canadiense de Protección de los Animales y aprobado por el comité de Ética del CIBICI-CONICET.

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo bajo estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del National Institutes of Health, Estados Unidos. El protocolo fue aprobado por el comité de Ética del CIBICI-CONICET.

### **Infección experimental de animales**

Ratones IL6KO o su base genética WT hembras de 6-8 semanas de edad se infectaron por vía intraperitoneal con  $1 \times 10^3$  trypomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen. Esta forma del parásito fue obtenida del torrente sanguíneo por punción cardíaca de animales previamente infectados, durante el pico de parasitemia que ocurre entre el día 14 a 18 post-infección. Cuando el experimento lo requería se utilizaron ratones control sin infectar. Los parásitos se mantuvieron mediante pases seriados de ratón a ratón.

### **Histología y marcadores de daño cardíaco**

Se extrajo sangre por punción intracardíaca a ratones WT e IL6KO previa anestesia con isofluorano a diferentes dpi. Luego, se perfundió con bomba a flujo constante cada animal con buffer fosfato salino frío pH 7,4 por 5 min para eliminar la sangre circulante. Se fijaron los corazones en formalina bufferizada 10% y luego fueron incluidos en parafina. Se realizaron cortes de 5 micras y se tiñeron con hematoxilina-eosina o tinción TUNEL para observarse en microscopio óptico Nikon Eclipse TE. La sangre anticoagulada con heparina fue centrifugada a 3500 rpm por 5 min, y se separó el plasma que fue derivado a Laboratorios Biocon para la determinación de CK total, CK-MB (BioSystems), GOT, GPT, Creatinina, Glucosa, Colesterol, Triglicéridos. La determinación de insulina se realizó con kit comercial (ALPCO).

### **Determinación de citoquinas**

La técnica de ELISA sándwich se realizó para la cuantificación de citoquinas y quemoquinas (IL1 $\beta$ , TNF, IL-12, IL-6, IL-17, MCP-1, IFN- $\gamma$ , IL-4, TGF $\beta$  e IL-10) en lisados de tejido cardíaco,

plasma y sobrenadantes de cultivo. Brevemente, las placas ELISA se incubaron con cada uno de los anticuerpos anti-citoquina de ratón (BD Pharmingen y eBioscience) a 4°C por 24 h, luego se lavaron y bloquearon los sitios libres. Posteriormente se incubaron las placas con los sobrenadantes obtenidos, y transcurridas 24 h, estas se sometieron a los correspondientes anticuerpos anti-citoquina marcados con biotina (BD Pharmingen y eBioscience) durante 1 h a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas se incubaron con estreptavidina conjugada con peroxidasa (BD Pharmingen) durante 30 min. La reacción se reveló usando el sustrato cromógeno 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Dako), antes de su lectura a 490 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad). Las curvas de calibración se generaron usando las citoquinas recombinantes correspondientes (BD Pharmingen y eBioscience). La concentración total de proteínas cardíacas fue determinada por el método de Bradford (Bio-Rad).

Para obtener los lisados, los corazones de ratones a distintos días post-infección se perfundieron, disgregaron mecánicamente y sometieron a buffer de lisis RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton x-1001%, desoxicolato de sodio 1%, SDS 0.1%, EDTA 1 mM, inhibidores de proteasas 1mM, PMSF 1mM y ortovanadato 1mM, pH 7.4) durante 30 min en hielo.

#### **Aislamiento de células infiltrantes de tejido cardíaco y citometría de flujo**

El aislamiento de leucocitos cardíacos fue llevado a cabo como se describió previamente<sup>206</sup>. Brevemente, el tejido cardíaco post-perfusión con buffer fosfato salino fue disgregado mecánica y enzimáticamente con tripsina 0,25% por 30 min. El tejido disgregado fue filtrado a través de filtros de 70 µm y luego las células fueron aisladas por gradiente de Percoll doble al 35% y 70%. Luego, las células viables fueron contadas en cámara de Neubauer con tinción de azul de tripán.

Para la determinación por citometría de flujo se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-CD11b APC, anti-F4/80 PE, anti-CD86 APCCy7, anti-CD206 PECy7, anti-Gr1 FITC, anti-CD39 biotina y estreptavidina FITC; anti-CD73 PERCPCy5.5; anti-TLR4 FITC.

Para la citometría de sangre periférica se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-CD11b APC, anti-Ly6C PECy7, anti-Ly6G APCCy7, anti-CD36 PE, anti-TLR4 PE o FITC, Receptor de insulina Alexa 488 (RnD), anti-CCR2 Brilliant Violet 421, anti-CCR5 PE, anti-CXCR2 PERCPCy5.5, CX3CR1 (conejo) y anti-IgG de conejo Alexa 488.

Para la medición de producción de especies reactivas se usaron las sondas DAF-FM y H<sub>2</sub>DCF-DA. Con el objetivo de evaluar la expresión intracelular de marcadores de perfil de macrófagos se usó: anti-iNOS hecho en conejo y anti-IgG de conejo Alexa 647 o Alexa 488 y anti-arginasa-1 FITC. Para permeabilizar las células se utilizó el kit de tinción de Foxp3. Las muestras fueron adquiridas en citómetro FACS Canto II y los datos fueron analizados con el software FlowJo.

**Tratamiento *in vivo* con IL-6**

IL-6 humana recombinante fue inyectada subcutáneamente en animales IL6KO (500 ng/g de peso corporal) antes de infectarlos. A 4 dpi se evaluaron las poblaciones circulantes en sangre periférica e infiltrantes de tejido cardíaco.

**Experimentos de transferencia adoptiva**

Se extrajeron células de bazo de animales WT e IL6KO, los glóbulos rojos se lisaron con buffer de lisis y luego se tiñeron con diferentes colorantes fluorescentes. A 2 dpi se le transfirió a animales WT e IL6KO una mezcla de  $15 \times 10^6$  células WT marcadas con eFluor 670 y  $15 \times 10^6$  células IL6KO marcadas con CFSE endovenosamente. Luego de 48 h se extrajo sangre periférica, bazo y corazón de los animales huésped. Las células fueron aisladas y teñidas para posteriormente ser analizadas en el citómetro.

**Diferenciación y polarización de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM)**

Los BMDM fueron obtenidos como se describió previamente<sup>207</sup>. Las células fueron cultivadas en medio suplementado con 13% de sobrenadante de la línea celular L929 (medio condicionado) por 7 días (añadiendo medio suplementado al día 4). Para la polarización se cultivaron 250.000 BMDM con rmIL-4 (20 ng/mL), rmIL-6 (20 ng/mL) y rmIL-10 (10 ng/mL) por 4 días.

Para evaluar el rol de IL-6 en modular el estrés oxidativo, WT y NLRP3KO BMDM fueron estimulados con LPS (100 ng/mL) solo o en combinación con rmIL-6 o anti-IL-1 $\beta$  (20  $\mu$ g/mL) por 24<sup>207</sup> h. Paralelamente, BMDM fueron infectadas en relación 1:1 parásito-célula por 3 h, y luego estimuladas o no con rm IL-6 o anti-IL-1 $\beta$  o anti-IL-1 $\beta$ +anti-TNF (25  $\mu$ g/mL) por 24 h. Los sobrenadantes fueron recolectados para medir citoquinas/NO y las células fueron teñidas para realizar citometría de flujo.

**Carga parasitaria**

El ADN genómico fue purificado de corazones de animales WT e IL6KO infectados usando TRIzol, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN de *T. cruzi* (GenBank AY520036) fue cuantificado por PCR en tiempo real utilizando sonda Taqman (Applied Biosystems) con las secuencias descritas por Piron *et al*<sup>208</sup>. El ADN genómico (1  $\mu$ g) fue amplificado y se expresó la carga parasitaria como unidades arbitrarias normalizando con la expresión de GAPDH.

**Medición de óxido nítrico**

El contenido de nitrato/nitrito en plasma, lisados de tejido cardíaco y sobrenadante de cultivo fue reducido a nitrito y posteriormente medido espectrofotométricamente por la reacción de Griess. La concentración de proteínas totales en muestras de corazón fue determinada por el método de Bradford.

**Detección de daño molecular por estrés oxidativo**

Los niveles de malondialdehído (MDA) fueron medidos por el test con ácido tiobarbitúrico (TBA) con separación y cuantificación de los aductos MDA-TBA por HPLC <sup>209</sup>. Brevemente, las proteínas de los lisados de corazón fueron precipitados con 5% de ácido tricloroacético. Las muestras fueron tratadas con TBA 0,25% por 45 min a 90°C, luego se pusieron en hielo y se analizaron por HPLC en una columna C18 con detección UV (532 nm). La fase móvil usada fue KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6):metanol (65:35), con una velocidad de flujo de 2 mL/min. Los niveles de MDA fueron calculados de una curva de calibración realizada por la hidrólisis ácida de 1,1,3,3-tetraethoxipropano y su reacción con TBA.

#### **Tratamiento con L-NAME**

Animales IL6KO fueron infectados y tratados inmediatamente con L-NAME en agua de bebida por una semana (50 mg/dL) para inhibir la síntesis de NO. La sobrevida de estos animales fue registrada hasta 65 dpi.

#### **Aislamiento de células infiltrantes de TAV y citometría de flujo**

El tejido adiposo de ratones infectados fue extraído post-perfusión, pesado y posteriormente disgregado con bisturí. Luego digerido enzimáticamente con colagenasa tipo II (0,8 mg/mL) por 45 min a 37°C. Luego se agregó buffer fosfato salino suplementado con suero bovino fetal para detener la reacción enzimática, se centrifugaron a 200 g y posteriormente se filtró. La fracción estromal vascular fue obtenida del sobrenadante.

Para la citometría de flujo se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-F4/80 PE, anti-CD86 APCCy7, anti-CD206 PECy7, anti-CD36 APC, anti-TLR4 FITC y la sonda para determinación de NO, DAF-FM.

#### **Análisis estadístico**

Para comparar la significancia estadística entre las diferentes condiciones experimentales, se realizó el análisis de la varianza empleando ANOVA (de una o de dos vías) asociado al test post hoc de Bonferroni. El test-t de *student* de dos colas también fue utilizado para la comparación. Valor de p menor a 0,05 fue considerado significativo. Para evaluar la sobrevida se utilizó el test Gehan-Breslow-Wilcoxon empleando el software GraphPad.

## **Parte II: Experimentos con muestras humanas**

### **Materiales, pacientes y métodos**

Todos los individuos involucrados en el trabajo fueron reclutados al “Hospital Nuestra Señora de la Misericordia” en Córdoba siguiendo los criterios de inclusión/exclusión descriptos en el Anexo I. Los estudios fueron llevados a cabo de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki. El consentimiento informado fue obtenido de todos los donantes antes de incluirlos en el estudio. Se extrajo sangre periférica de 46 individuos chagásicos y no chagásicos (25-60 años), utilizando un protocolo que fue revisado y aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud del Adulto, Ministerio de Salud de Córdoba (Número de acta 194/2014). Sujetos que presentaban HAI y ELISA positivo fueron considerados seropositivos. Estos pacientes (n = 22) fueron sometidos a electrocardiograma, ecocardiograma y rayos X. El grupo de pacientes seronegativos (n = 24) fueron serológicamente negativos para anticuerpos anti-*T. cruzi*. Todos los donantes con enfermedad crónica (salvo enfermedad de Chagas) o patología inflamatoria, velocidad de eritrosedimentación > 30 mm o recuento de glóbulos blancos <4000/mm<sup>3</sup> o > 10000/mm<sup>3</sup> fueron excluidos del estudio.

### **Obtención de sangre periférica**

Se extrajo aproximadamente 15 mL de sangre a cada individuo por punción venosa y se colocó en tubos con heparina. Una alícuota de 50 µL de sangre periférica se utilizó para citometría de flujo, 1,5 mL se utilizaron para obtener plasma y 10 mL para la obtención de CMSP a través de gradiente de densidad Ficoll-Hypaque PLUS.

### **Citometría de flujo en fresco/ex vivo**

Para evaluar los subtipos de linfocitos T, 50 µL de sangre periférica se incubaron con anticuerpo anti-CD3 Alexa 488 o PerCPCy5.5, anti-CD4 Alexa 647, anti-CD8 PECy7, anti-nitrotirosina hecho en conejo (Sigma) y anti-IgG de conejo Alexa 647 (Thermofisher) o anti-CD20 PECy7. La expresión intracelular de la cadena ζ del TCR fue evaluada con el anticuerpo anti-TCRζ PE. Para la evaluación de las subpoblaciones de monocitos se utilizaron anticuerpos anti-CD14 PECy5, anti-CD16 PECy7, anti-CD73PE y anti-CD39 biotina combinado con estreptavidina APC. Luego de 30 minutos, se lisaron los glóbulos rojos con buffer de lisis y las células fueron adquiridas en un citometro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson) y analizadas con el programa FlowJo.

Para la determinación de especies reactivas se utilizaron las sondas, reactivo de Griess y protocolo descriptos en la parte I.

### **Viabilidad Celular**

Los leucocitos de sangre periférica fueron incubados con anti-CD3 Alexa 488, anti-CD4 Alexa 647, anti-CD8 PECy7 y luego con 5 µL de AnnexinaV PE durante 15 min en hielo. Las células

se tiñeron con 5 µl de 7AAD antes de su adquisición en el citómetro, con un mínimo de 30.000 eventos para cada condición. Se evaluó el porcentaje de células viables (Annexina V- 7AAD-), células apoptóticas (Annexina V+ 7AAD-), células necróticas (Annexina V- 7AAD+), y células apoptóticas tardías (Annexina V+ 7AAD+).

La tinción de sangre periférica con anticuerpos contra CD45RA y CCR7 revela cuatro subpoblaciones de células T: las células T vírgenes/naïve son CD45RA+ CCR7+, las células de CM son CD45RA-CCR7+, células de EM son CD45RA- CCR7-, y las células EMRA son CD45RA+ CCR7-<sup>210</sup>. Para determinar la expresión de Bcl-2, se marcó la superficie celular y luego se permeabilizó la célula con buffer de tinción Foxp3 (eBioscience). Finalmente las células fueron teñidas con anti-Bcl-2 hecho en conejo (Cell Signaling) y anti-IgG de conejo Alexa 488 (Thermofisher), adquiridas en citómetro de flujo FACS Canto II y analizadas con el programa FlowJo.

#### **Funcionalidad de células T CD8+ y monocitos**

Las CMSP fueron cultivadas con anti-CD107a PE, monensina, brefeldina A, PMA e ionomicina por 4 h, después se marcó la superficie con anti-CD3 Alexa 488 y anti-CD8 PECy7 por 30 min. Luego se permeabilizaron las células con kit de para detección de citoquinas (BD Bioscience) y tiñeron con anti-IFN $\gamma$  FITC, anti-TNF APC y anti-IL-2 APCCy7.

Para evaluar el efecto de la activación vía TCR, se cultivaron CMSP con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (0,5 mg/mL) por 72 horas. Luego se agregó monensina, brefeldina A y anti-CD107a PE durante 6 horas y se tiñeron en superficie con anti-CD8 APCCy7, anti-CCR7 Alexa 488, anti-NT (hecho en conejo) y anti-IgG de conejo Alexa 647. Luego fueron permeabilizadas con kit para detección de citoquinas y marcadas con anti-IL-2 PECy7, anti-TNF PerCPCy5.5 o anti-IFN $\gamma$  PerCPCy5.5.

Para evaluar la funcionalidad de los monocitos se cultivaron CMSP con LPS (100 ng/mL), monensina y brefeldina A por 4 h, después se marcó la superficie con anti-CD14 PECy5 y anti-CD16PECy7 por 30 min y se permeabilizaron las células con kit para determinación de citoquinas o para ver expresión de factores nucleares, utilizando anticuerpos anti-IL-10 APC, anti-IL-6 PE, anti-IL-1 $\beta$  FITC o anti-HIF hecho en conejo combinado con anti-conejo Alexa 647.

#### **Agotamiento de las células T CD8+**

Se cultivaron CMSP con anti-CD3 (1 µg/mL) y anti-CD28 (0,5 mg/mL). Después de 72 horas, las células se tiñeron con anti-CD8 APCCy7, anti-Tim3 PerCPCy5.5, anti-PD1 PECy7, anti-CTLA4 PE, anti-CCR7 Alexa 488 y anti-NT hecho en conejo y anti-IgG de conejo Alexa 647.

#### **Cuantificación de citoquinas**

Los niveles plasmáticos de TNF, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  e IL-4 fueron determinados utilizando perlas fluorescentes para citometría de flujo (Biolegend). Brevemente, se incubó el plasma con perlas de captura para cada citoquina por 2 horas a temperatura ambiente con agitación y luego se

agregó estreptavidina PE por 30 minutos. En los sobrenadantes de cultivo y en plasma los niveles de IL-1 $\beta$  fueron medidos por ELISA (eBioscience).

### **Cultivo de CMSP y parásitos**

Las monocapas de células VERO fueron infectadas con trypomastigotes de *T. cruzi* (cepa Tulahuen) por 3 horas, luego fueron lavadas y mantenidas en medio de cultivo RPMI a 37°C por 7 días. Los parásitos fueron recolectados del sobrenadante de las células infectadas.

Las CMSP de individuos no chagásicos fueron cultivadas con trypomastigotes (relación 1:1) por 3 horas, y luego fueron lavadas y cultivadas con IL-6 recombinante bioactiva (20 ng/mL), con anti-IL-6 (2  $\mu$ g/mL) o anti-IL-6 más anti-IL-1 $\beta$  (2  $\mu$ g/ml) o mantenidas en medio. Luego, se evaluó la nitración de las células y los niveles de IL-1 $\beta$  y producción de NO por sonda fluorescente y en sobrenadante de cultivo. Además, sangre entera de pacientes chagásicos y donantes controles fue infectada con trypomastigotes y cultivada con IL-6 o mantenida en medio de cultivo por 24 h, luego las células fueron teñidas para evaluar la producción de NO y ERO y la nitración por citometría de flujo.

### **Metodología Seahorse**

*Para la determinación de ECAR, se aislaron monocitos de un donante seronegativo con el kit de purificación positiva para CD14 (EasySep) y se plaquearon 300.000 células/pocillo en 6 pocillos de las placas para Seahorse pretratadas para mejorar su adherencia. Se infectaron las células de 3 pocillos con trypomastigotes en una relación 1:1 por 24 h. Luego de ese tiempo, se pusieron las células en medio sin glucosa ni piruvato por 1 h a 37°C y luego se determinó ECAR frente al agregado secuencial de glucosa, oligomicina y 2-DG.*

### **Evaluación de activación de la vía glucolítica**

*Se plaquearon 250.000 CMSP, se incubaron con 2-DG (11mM) por 1 h y luego se infectaron con trypomastigotes en relación 1:1, luego de 3 h se lavaron los parásitos y se incubaron las células con por 24 h. Luego se frenó la liberación de citoquinas con 4 h de monensina y brefeldina A y se marcó en superficie con anticuerpos anti-CD3 Alexa 488, anti-CD8 PECy7, anti-NT hecho en conejo y anti IgG de conejo Alexa 647 o anti-CD14 PECy5, anti-CD64 APCCy7, anti-CD206 APC por 30 min y luego se fijaron las células con buffer para determinación de citoquinas y se evaluó anti-IL-1 $\beta$ FITC, anti-IL-6 PE y anti-IL-10 PECy7.*

## **Trabajos publicados durante el desarrollo de la presente tesis doctoral**

- IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. **Sanmarco LM**, Ponce NE, Visconti LM, Eberhardt N, Theumer MG, Minguez AR, Aoki MP. *Biochim Biophys Acta*. 2017 Apr;1863(4):857-869. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.01.006. Epub 2017 Jan 11.
- IL-6 Improves the Nitric Oxide-Induced Cytotoxic CD8+ T Cell Dysfunction in Human Chagas Disease. **Sanmarco LM**, Visconti LM, Eberhardt N, Ramello MC, Ponce NE, Spitale NB, Vozza ML, Bernardi GA, Gea S, Minguez AR, Aoki MP. *Front Immunol*. 2016 Dec 23;7:626. doi: 10.3389/fimmu.2016.00626. eCollection 2016.
- CD73 Inhibition Shifts Cardiac Macrophage Polarization toward a Microbicidal Phenotype and Ameliorates the Outcome of Experimental Chagas Cardiomyopathy. Ponce NE, **Sanmarco LM**, Eberhardt N, García MC, Rivarola HW, Cano RC, Aoki MP. *J Immunol*. 2016 Aug 1;197(3):814-23. doi: 10.4049/jimmunol.1600371. Epub 2016 Jun 22.
- Clomipramine and Benznidazole Act Synergistically and Ameliorate the Outcome of Experimental Chagas Disease. García MC, Ponce NE, **Sanmarco LM**, Manzo RH, Jimenez-Kairuz AF, Aoki MP. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 May 23;60(6):3700-8. doi: 10.1128/AAC.00404-16. Print 2016 Jun.
- Chronic *Trypanosoma cruzi* infection potentiates adipose tissue macrophage polarization toward an anti-inflammatory M2 phenotype and contributes to diabetes progression in a diet-induced obesity model. Cabalén ME, Cabral MF, **Sanmarco LM**, Andrada MC, Onofrio LI, Ponce NE, Aoki MP, Gea S, Cano RC. *Oncotarget*. 2016 Mar 22;7(12):13400-15. doi:10.18632/oncotarget.7630.

## **Anexo I**

### **Criterios de Inclusión y exclusión:**

#### Criterios de Inclusión:

1. Individuos de 18 a 60 años.
2. Que firmen el consentimiento informado

#### Criterios de exclusión:

1. Presencia de enfermedades subagudas o crónicas conocidas.
  - neurológicas o neuromusculares
  - renales
  - hepáticas
  - cardiovasculares (a excepción de cardiopatía por enfermedad de Chagas)
  - óseas
  - inmunológicas
  - reumatológicas
  - respiratorias
2. Presencia de signos o síntomas clínicos compatibles con infección o enfermedad inflamatoria aguda.
3. Presencia de al menos uno de los siguientes hallazgos de laboratorio compatibles con infección o enfermedad inflamatoria aguda, al momento de la inclusión al estudio
  - VSG >20 mm
  - leucocitos e sangre periférica < 4000 /mm<sup>3</sup> o >10000/mm<sup>3</sup>
  - plaquetas < 150.000 o > 450.000/mm<sup>3</sup>.
4. Haber recibido vacunas en los últimos 30 días o Inmunoglobulinas en las últimas 6 semanas.

**Bibliografía**

- 1 Gascon, J., Bern, C. & Pinazo, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta tropica* **115**, 22-27, doi:10.1016/j.actatropica.2009.07.019 (2010).
- 2 Jackson, Y., Pinto, A. & Pett, S. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. *Tropical medicine & international health : TM & IH* **19**, 212-218, doi:10.1111/tmi.12235 (2014).
- 3 Organization, W. H. WHO fact sheet no. 340. (2016).
- 4 Cucunuba, Z. M., Okuwoga, O., Basanez, M. G. & Nouvellet, P. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & vectors* **9**, 42, doi:10.1186/s13071-016-1315-x (2016).
- 5 Martins-Melo, F. R., Ramos, A. N., Jr., Alencar, C. H. & Heukelbach, J. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. *Journal of infection in developing countries* **6**, 817-824, doi:10.3855/jidc.2459 (2012).
- 6 2011-2015, P. N. d. C. Res. 867/2012. Boletín Oficial. (2012).
- 7 Hotez, P. J. *et al.* Control of neglected tropical diseases. *The New England journal of medicine* **357**, 1018-1027, doi:357/10/1018 10.1056/NEJMra064142 (2007).
- 8 WHO. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *WHO Technical Report Series Fact sheet N°340* (2012).
- 9 Gurtler, R. E., Segura, E. L. & Cohen, J. E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerging infectious diseases* **9**, 29-32, doi:10.3201/eid0901.020274 (2003).
- 10 Benjamin, R. J. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in North America and Spain: evidence in support of transfusion transmission. *Transfusion* **52**, 1913-1921; quiz 1912, doi:10.1111/j.1537-2995.2011.03554.x (2012).
- 11 Rassi, A., Jr., Rassi, A. & Marcondes de Rezende, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am* **26**, 275-291, doi:S0891-5520(12)00011-6 10.1016/j.idc.2012.03.002 (2012).
- 12 Secretaria de Vigilância em Saúde, A. e. C. d. D. d. C. a. Brasil. (2011).
- 13 Miles, M. A., Feliciangeli, M. D. & de Arias, A. R. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *Bmj* **326**, 1444-1448, doi:10.1136/bmj.326.7404.1444326/7404/1444 [pii] (2003).
- 14 Kirchhoff, L. V., Weiss, L. M., Wittner, M. & Tanowitz, H. B. Parasitic diseases of the heart. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **9**, 706-723 (2004).
- 15 Shikanai-Yasuda, M. A. & Carvalho, N. B. Oral transmission of Chagas disease. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **54**, 845-852, doi:10.1093/cid/cir956 (2012).
- 16 Rassi, A., Jr., Rassi, A. & Marin-Neto, J. A. Chagas disease. *Lancet* **375**, 1388-1402, doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X (2010).
- 17 Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C. & Simoes, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* **115**, 1109-1123, doi:115/9/1109 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296 (2007).
- 18 Girones, N. & Fresno, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol* **19**, 19-22, doi:S1471492202000065 [pii] (2003).
- 19 Bonney, K. M. & Engman, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr Mol Med* **8**, 510-518 (2008).
- 20 Kierszenbaum, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clinical microbiology reviews* **12**, 210-223 (1999).

- 21 Gutierrez, F. R., Guedes, P. M., Gazzinelli, R. T. & Silva, J. S. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol* **31**, 673-685, doi:PIM1108 10.1111/j.1365-3024.2009.01108.x (2009).
- 22 Tarleton, R. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol* **31**, 550-554 (2001).
- 23 Garcia, S. *et al.* Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1521-1528, doi:49/4/1521 10.1128/AAC.49.4.1521-1528.2005 (2005).
- 24 C., C. Mem Inst Oswaldo Cruz (1909).
- 25 van Furth, R. & Cohn, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* **128**, 415-435 (1968).
- 26 Sawyer, R. T., Strausbauch, P. H. & Volkman, A. Resident macrophage proliferation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **46**, 165-170 (1982).
- 27 Volkman, A., Chang, N. C., Strausbauch, P. H. & Morahan, P. S. Differential effects of chronic monocyte depletion on macrophage populations. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **49**, 291-298 (1983).
- 28 Ginhoux, F. *et al.* Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* **330**, 841-845, doi:10.1126/science.1194637 (2010).
- 29 Yona, S. *et al.* Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* **38**, 79-91, doi:10.1016/j.immuni.2012.12.001 (2013).
- 30 Epelman, S. *et al.* Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* **40**, 91-104, doi:10.1016/j.immuni.2013.11.019 (2014).
- 31 van Furth, R. & Sluiter, W. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. *J Exp Med* **163**, 474-479 (1986).
- 32 Swirski, F. K. *et al.* Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* **325**, 612-616, doi:10.1126/science.1175202 (2009).
- 33 Libby, P., Nahrendorf, M., Pittet, M. J. & Swirski, F. K. Diversity of denizens of the atherosclerotic plaque: not all monocytes are created equal. *Circulation* **117**, 3168-3170, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.783068 (2008).
- 34 Skrzeczynska-Moncznik, J. *et al.* Peripheral blood CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* **67**, 152-159, doi:10.1111/j.1365-3083.2007.02051.x (2008).
- 35 Smedman, C. *et al.* FluoroSpot Analysis of TLR-Activated Monocytes Reveals Several Distinct Cytokine-Secreting Subpopulations. *Scand J Immunol* **75**, 249-258, doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02641.x (2012).
- 36 Serbina, N. V. & Pamer, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature immunology* **7**, 311-317, doi:10.1038/ni1309 (2006).
- 37 Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71-82 (2003).
- 38 King, I. L., Dickendesher, T. L. & Segal, B. M. Circulating Ly-6C<sup>+</sup> myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* **113**, 3190-3197, doi:10.1182/blood-2008-07-168575 (2009).
- 39 Ginhoux, F. *et al.* Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nature immunology* **7**, 265-273, doi:10.1038/ni1307 (2006).
- 40 Tidball, J. G. & Villalta, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **298**, R1173-1187, doi:10.1152/ajpregu.00735.2009 (2010).

- 41 Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology* **11**, 889-896, doi:10.1038/ni.1937 (2010).
- 42 Coelho, P. S. *et al.* Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. *J Leukoc Biol* **71**, 837-844 (2002).
- 43 Schmitz, V., Svensjo, E., Serra, R. R., Teixeira, M. M. & Scharfstein, J. Proteolytic generation of kinins in tissues infected by *Trypanosoma cruzi* depends on CXC chemokine secretion by macrophages activated via Toll-like 2 receptors. *J Leukoc Biol* **85**, 1005-1014, doi:10.1189/jlb.1108693 (2009).
- 44 Kayama, H. & Takeda, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes and infection* **12**, 511-517, doi:10.1016/j.micinf.2010.03.005 (2010).
- 45 Plata, F., Wietzerbin, J., Pons, F. G., Falcoff, E. & Eisen, H. Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi* in vitro. *European journal of immunology* **14**, 930-935, doi:10.1002/eji.1830141013 (1984).
- 46 Vespa, G. N., Cunha, F. Q. & Silva, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun* **62**, 5177-5182 (1994).
- 47 Tanowitz, H. B. *et al.* Cytokine gene expression of endothelial cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of infectious diseases* **166**, 598-603 (1992).
- 48 Ponce, N. E. *et al.* Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during *Trypanosoma cruzi* murine infection. *Medical microbiology and immunology* **201**, 145-155, doi:10.1007/s00430-011-0216-z (2012).
- 49 Pinto, A. R. *et al.* An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile. *PLoS one* **7**, e36814, doi:10.1371/journal.pone.0036814 (2012).
- 50 Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* **204**, 3037-3047, doi:10.1084/jem.20070885 (2007).
- 51 Albareda, M. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *International immunology* **18**, 465-471, doi:10.1093/intimm/dxh387 (2006).
- 52 Arguello, R. J. *et al.* Presence of antigen-experienced T cells with low grade of differentiation and proliferative potential in chronic Chagas disease myocarditis. *PLoS neglected tropical diseases* **8**, e2989, doi:10.1371/journal.pntd.0002989 (2014).
- 53 Higuchi Mde, L. *et al.* Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* **2**, 101-106, doi:10.1016/1054-8807(93)90021-S (1993).
- 54 Reis, D. D. *et al.* Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg* **48**, 637-644 (1993).
- 55 Mateus, J. *et al.* Antiparasitic Treatment Induces an Improved CD8+ T Cell Response in Chronic Chagasic Patients. *J Immunol* **198**, 3170-3180, doi:10.4049/jimmunol.1602095 (2017).
- 56 Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal* **334 ( Pt 2)**, 297-314 (1998).

- 57 Mauer, J. *et al.* Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nature immunology* **15**, 423-430, doi:10.1038/ni.2865 (2014).
- 58 Kopf, M. *et al.* Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* **368**, 339-342, doi:10.1038/368339a0 (1994).
- 59 Greenhill, C. J. *et al.* IL-6 trans-signaling modulates TLR4-dependent inflammatory responses via STAT3. *J Immunol* **186**, 1199-1208, doi:10.4049/jimmunol.1002971 (2011).
- 60 Silver, J. S., Stumhofer, J. S., Passos, S., Ernst, M. & Hunter, C. A. IL-6 mediates the susceptibility of glycoprotein 130 hypermorphs to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **187**, 350-360, doi:10.4049/jimmunol.1004144 (2011).
- 61 Jenkins, B. J. *et al.* Imbalanced gp130-dependent signaling in macrophages alters macrophage colony-stimulating factor responsiveness via regulation of c-fms expression. *Molecular and cellular biology* **24**, 1453-1463 (2004).
- 62 Hegde, S., Pahne, J. & Smola-Hess, S. Novel immunosuppressive properties of interleukin-6 in dendritic cells: inhibition of NF-kappaB binding activity and CCR7 expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 1439-1441, doi:10.1096/fj.03-0969fje (2004).
- 63 Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M. B., Dinarello, C. A. & Mier, J. W. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* **83**, 113-118 (1994).
- 64 Beaman, M. H., Hunter, C. A. & Remington, J. S. Enhancement of intracellular replication of *Toxoplasma gondii* by IL-6. Interactions with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* **153**, 4583-4587 (1994).
- 65 Nagabhushanam, V. *et al.* Innate inhibition of adaptive immunity: Mycobacterium tuberculosis-induced IL-6 inhibits macrophage responses to IFN-gamma. *J Immunol* **171**, 4750-4757 (2003).
- 66 Ma, C. S., Deenick, E. K., Batten, M. & Tangye, S. G. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med* **209**, 1241-1253, doi:10.1084/jem.20120994 (2012).
- 67 Stumhofer, J. S. *et al.* Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nature immunology* **8**, 1363-1371, doi:10.1038/ni1537 (2007).
- 68 McGeachy, M. J. *et al.* TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nature immunology* **8**, 1390-1397, doi:10.1038/ni1539 (2007).
- 69 Lu, Z. Y. *et al.* High amounts of circulating interleukin (IL)-6 in the form of monomeric immune complexes during anti-IL-6 therapy. Towards a new methodology for measuring overall cytokine production in human in vivo. *European journal of immunology* **22**, 2819-2824, doi:10.1002/eji.1830221110 (1992).
- 70 Rattazzi, M. *et al.* C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders? *Journal of hypertension* **21**, 1787-1803, doi:10.1097/01.hjh.0000084735.53355.44 (2003).
- 71 Tsutamoto, T. *et al.* Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* **31**, 391-398 (1998).
- 72 Hogue, M., Mandi, Y., Csanady, M., Sepp, R. & Buzas, K. Comparison of circulating levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in hypertrophic cardiomyopathy and in idiopathic dilated cardiomyopathy. *The American journal of cardiology* **94**, 249-251, doi:10.1016/j.amjcard.2004.03.078 (2004).
- 73 Ponce, N. E. *et al.* *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, modulates interleukin-6-induced STAT3 phosphorylation via gp130 cleavage in different host cells.

- Biochim Biophys Acta* **1832**, 485-494, doi:S0925-4439(12)00288-8 10.1016/j.bbadis.2012.12.003 (2013).
- 74 Kunisada, K. *et al.* Activation of gp130 transduces hypertrophic signals via STAT3 in cardiac myocytes. *Circulation* **98**, 346-352 (1998).
- 75 Craig, R. *et al.* p38 MAPK and NF-kappa B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. Evidence for a cytoprotective autocrine signaling pathway in a cardiac myocyte model system. *The Journal of biological chemistry* **275**, 23814-23824 (2000).
- 76 Yamauchi-Takahara, K. & Kishimoto, T. Cytokines and their receptors in cardiovascular diseases--role of gp130 signalling pathway in cardiac myocyte growth and maintenance. *International journal of experimental pathology* **81**, 1-16 (2000).
- 77 Savino, W. *et al.* Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine & growth factor reviews* **18**, 107-124 (2007).
- 78 Arocena, A. R. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells are key players in the resolution of inflammation during a model of acute infection. *European journal of immunology* **44**, 184-194, doi:10.1002/eji.201343606 (2014).
- 79 Gao, W. & Pereira, M. A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* **32**, 167-170 (2002).
- 80 Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S. & Hasko, G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* **19**, 355-367, doi:S1471-4914(13)00054-3 10.1016/j.molmed.2013.03.005 (2013).
- 81 Deaglio, S. & Robson, S. C. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Advances in pharmacology* **61**, 301-332, doi:10.1016/B978-0-12-385526-8.00010-2 (2011).
- 82 Eltzschig, H. K. *et al.* Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection. *Blood* **113**, 224-232, doi:10.1182/blood-2008-06-165746 (2009).
- 83 Bastid, J. *et al.* ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene* **32**, 1743-1751, doi:10.1038/onc.2012.269 (2013).
- 84 Synnestvedt, K. *et al.* Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *The Journal of clinical investigation* **110**, 993-1002, doi:10.1172/JCI15337 (2002).
- 85 Eltzschig, H. K. *et al.* Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J Exp Med* **198**, 783-796, doi:10.1084/jem.20030891 (2003).
- 86 Beavis, P. A., Stagg, J., Darcy, P. K. & Smyth, M. J. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in immunology* **33**, 231-237, doi:10.1016/j.it.2012.02.009 (2012).
- 87 Regateiro, F. S. *et al.* Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF-beta. *European journal of immunology* **41**, 2955-2965, doi:10.1002/eji.201141512 (2011).
- 88 Levesque, S. A., Kukulski, F., Enyoloji, K., Robson, S. C. & Sevigny, J. NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages. *European journal of immunology* **40**, 1473-1485, doi:10.1002/eji.200939741 (2010).
- 89 Hasko, G. & Pacher, P. Regulation of macrophage function by adenosine. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**, 865-869, doi:32/4/865 10.1161/ATVBAHA.111.226852 (2012).
- 90 Ponce, N. E. *et al.* CD73 Inhibition Shifts Cardiac Macrophage Polarization toward a Microbicidal Phenotype and Ameliorates the Outcome of Experimental Chagas Cardiomyopathy. *J Immunol*, doi:10.4049/jimmunol.1600371 (2016).
- 91 Poth, J. M., Brodsky, K., Ehrentraut, H., Grenz, A. & Eltzschig, H. K. Transcriptional control of adenosine signaling by hypoxia-inducible transcription factors during ischemic or

- inflammatory disease. *J Mol Med (Berl)* **91**, 183-193, doi:10.1007/s00109-012-0988-7 (2013).
- 92 Hagen, T., Taylor, C. T., Lam, F. & Moncada, S. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science* **302**, 1975-1978, doi:10.1126/science.1088805 (2003).
- 93 Groemping, Y. & Rittinger, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *The Biochemical journal* **386**, 401-416, doi:10.1042/BJ20041835 (2005).
- 94 Piacenza, L., Alvarez, M. N., Peluffo, G. & Radi, R. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Current opinion in microbiology* **12**, 415-421, doi:10.1016/j.mib.2009.06.011 (2009).
- 95 Alvarez, M. N., Piacenza, L., Irigoin, F., Peluffo, G. & Radi, R. Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Archives of biochemistry and biophysics* **432**, 222-232, doi:10.1016/j.abb.2004.09.015 (2004).
- 96 Nakamura, Y. *et al.* Nitric oxide in breast cancer: induction of vascular endothelial growth factor-C and correlation with metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res* **12**, 1201-1207, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1269 (2006).
- 97 Esterbauer, H., Schaur, R. J. & Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine* **11**, 81-128 (1991).
- 98 Girotti, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of lipid research* **39**, 1529-1542 (1998).
- 99 Schmielau, J. & Finn, O. J. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer research* **61**, 4756-4760 (2001).
- 100 Mazzoni, A. *et al.* Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol* **168**, 689-695 (2002).
- 101 Nagaraj, S. *et al.* Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nature medicine* **13**, 828-835, doi:10.1038/nm1609 (2007).
- 102 Gupta, S., Dhiman, M., Wen, J. J. & Garg, N. J. ROS signalling of inflammatory cytokines during *Trypanosoma cruzi* infection. *Advances in parasitology* **76**, 153-170, doi:10.1016/B978-0-12-385895-5.00007-4 (2011).
- 103 Wen, J. J., Vyatkina, G. & Garg, N. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. *Free radical biology & medicine* **37**, 1821-1833, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.018 (2004).
- 104 Wen, J. J. *et al.* Phenyl-alpha-tert-butyl-nitron and benzonidazole treatment controlled the mitochondrial oxidative stress and evolution of cardiomyopathy in chronic chagasic Rats. *Journal of the American College of Cardiology* **55**, 2499-2508, doi:10.1016/j.jacc.2010.02.030 (2010).
- 105 Caterson, I. D. *et al.* Prevention Conference VII: Obesity, a worldwide epidemic related to heart disease and stroke: Group III: worldwide comorbidities of obesity. *Circulation* **110**, e476-483, doi:10.1161/01.CIR.0000140114.83145.59 (2004).
- 106 Eckel, R. H., Grundy, S. M. & Zimmet, P. Z. The metabolic syndrome. *Lancet* **365**, 1415-1428, doi:10.1016/S0140-6736(05)66378-7 (2005).
- 107 Galassi, A., Reynolds, K. & He, J. Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *The American journal of medicine* **119**, 812-819, doi:10.1016/j.amjmed.2006.02.031 (2006).
- 108 Einhorn, D. *et al.* American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* **9**, 237-252 (2003).

- 109 Alberti, K. G. & Zimmet, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* **15**, 539-553, doi:10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S (1998).
- 110 Alberti, K. G. & Zimmet, P. Z. New diagnostic criteria and classification of diabetes--again? *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* **15**, 535-536, doi:10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<535::AID-DIA670>3.0.CO;2-Q (1998).
- 111 Balkau, B. & Charles, M. A. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* **16**, 442-443 (1999).
- 112 Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Rifkind, B. M. & Kuller, L. H. Cholesterol lowering in the elderly population. Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program. *Archives of internal medicine* **159**, 1670-1678 (1999).
- 113 Monteiro, R., Keating, E., Castro, P. & Azevedo, I. Abdominal cavity compliance: a participant more in the building up of visceral obesity. *Obesity* **17**, 937, doi:10.1038/oby.2009.34 (2009).
- 114 Parhofer, K. G. & Barrett, P. H. Thematic review series: patient-oriented research. What we have learned about VLDL and LDL metabolism from human kinetics studies. *Journal of lipid research* **47**, 1620-1630, doi:10.1194/jlr.R600013-JLR200 (2006).
- 115 Sethi, J. K. & Vidal-Puig, A. J. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *Journal of lipid research* **48**, 1253-1262, doi:10.1194/jlr.R700005-JLR200 (2007).
- 116 Strissel, K. J. *et al.* Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* **56**, 2910-2918, doi:10.2337/db07-0767 (2007).
- 117 Ozcan, U. *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457-461, doi:10.1126/science.1103160 (2004).
- 118 Nishimura, S. *et al.* CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature medicine* **15**, 914-920, doi:10.1038/nm.1964 (2009).
- 119 Mills, E. L. *et al.* Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell* **167**, 457-470 e413, doi:10.1016/j.cell.2016.08.064 (2016).
- 120 Tannahill, G. M. *et al.* Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature* **496**, 238-242, doi:10.1038/nature11986 (2013).
- 121 Andrisse, S. *et al.* Role of GLUT1 in regulation of reactive oxygen species. *Redox Biol* **2**, 764-771, doi:10.1016/j.redox.2014.03.004 (2014).
- 122 O'Neill, L. A. & Pearce, E. J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med* **213**, 15-23, doi:10.1084/jem.20151570 (2016).
- 123 Ghesquiere, B., Wong, B. W., Kuchnio, A. & Carmeliet, P. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature* **511**, 167-176, doi:10.1038/nature13312 (2014).
- 124 Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E. & Taylor, P. R. Tissue-resident macrophages. *Nature immunology* **14**, 986-995, doi:10.1038/ni.2705 (2013).
- 125 Bonner, F., Borg, N., Burghoff, S. & Schrader, J. Resident cardiac immune cells and expression of the ectonucleotidase enzymes CD39 and CD73 after ischemic injury. *PLoS one* **7**, e34730, doi:10.1371/journal.pone.0034730 PONE-D-12-02328 [pii] (2012).
- 126 Cai, M. *et al.* Transgenic over expression of ectonucleotide triphosphate diphosphohydrolase-1 protects against murine myocardial ischemic injury. *Journal of molecular and cellular cardiology* **51**, 927-935, doi:S0022-2828(11)00378-6 10.1016/j.yjmcc.2011.09.003 (2011).

- 127 Ceriello, A. & Motz, E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**, 816-823, doi:10.1161/01.ATV.0000122852.22604.78 (2004).
- 128 Urakawa, H. *et al.* Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **88**, 4673-4676, doi:10.1210/jc.2003-030202 (2003).
- 129 Nosadini, R. & Tonolo, G. Role of oxidized low density lipoproteins and free fatty acids in the pathogenesis of glomerulopathy and tubulointerstitial lesions in type 2 diabetes. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* **21**, 79-85, doi:10.1016/j.numecd.2010.10.002 (2011).
- 130 Stewart, C. R. *et al.* CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature immunology* **11**, 155-161, doi:10.1038/ni.1836 (2010).
- 131 Viotti, R. *et al.* Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 635-639, doi:AAC.01662-13 10.1128/AAC.01662-13 (2014).
- 132 Mann, D. L. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circulation research* **91**, 988-998 (2002).
- 133 Mann, D. L. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. *Circulation research* **108**, 1133-1145, doi:108/9/1133 10.1161/CIRCRESAHA.110.226936 (2011).
- 134 Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews. Immunology* **11**, 85-97, doi:10.1038/nri2921 (2011).
- 135 Ataie-Kachoe, P., Pourgholami, M. H. & Morris, D. L. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. *Cytokine & growth factor reviews* **24**, 163-173, doi:10.1016/j.cytogfr.2012.09.001 (2013).
- 136 Kiecolt-Glaser, J. K. *et al.* Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 9090-9095, doi:10.1073/pnas.1531903100 (2003).
- 137 Wong, C. K. *et al.* Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clinical and experimental immunology* **125**, 177-183 (2001).
- 138 Heinrich, P. C. *et al.* Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* **374**, 1-20, doi:10.1042/BJ20030407 (2003).
- 139 Fischer, P. & Hilfiker-Kleiner, D. Survival pathways in hypertrophy and heart failure: the gp130-STAT3 axis. *Basic research in cardiology* **102**, 279-297, doi:10.1007/s00395-007-0658-z (2007).
- 140 Kishimoto, T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annual review of immunology* **23**, 1-21, doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115806 (2005).
- 141 Alten, J. A. *et al.* Prevention of hypovolemic circulatory collapse by IL-6 activated Stat3. *PLoS one* **3**, e1605, doi:10.1371/journal.pone.0001605 (2008).
- 142 Fukada, T. *et al.* Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity*. **5**, 449-460 (1996).
- 143 Fischer, P. & Hilfiker-Kleiner, D. Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**, S414-427, doi:bjp20081 10.1038/bjp.2008.1 (2008).
- 144 Yajima, T. *et al.* Innate defense mechanism against virus infection within the cardiac myocyte requiring gp130-STAT3 signaling. *Circulation* **114**, 2364-2373 (2006).

- 145 Negoro, S. *et al.* Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **47**, 797-805, doi:S0008-6363(00)00138-3 [pii] (2000).
- 146 Zhang, C. *et al.* Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is essential for macrophage infiltration and myoblast proliferation during muscle regeneration. *The Journal of biological chemistry* **288**, 1489-1499, doi:10.1074/jbc.M112.419788 (2013).
- 147 Lin, Z. Q., Kondo, T., Ishida, Y., Takayasu, T. & Mukaida, N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol* **73**, 713-721 (2003).
- 148 Poffenberger, M. C. *et al.* Lack of IL-6 during coxsackievirus infection heightens the early immune response resulting in increased severity of chronic autoimmune myocarditis. *PLoS one* **4**, e6207, doi:10.1371/journal.pone.0006207 (2009).
- 149 Kanda, T. *et al.* Modification of viral myocarditis in mice by interleukin-6. *Circulation research* **78**, 848-856 (1996).
- 150 Tanaka, T. *et al.* Overexpression of interleukin-6 aggravates viral myocarditis: impaired increase in tumor necrosis factor-alpha. *Journal of molecular and cellular cardiology* **33**, 1627-1635, doi:10.1006/jmcc.2001.1428 (2001).
- 151 Florholmen, G. *et al.* Leukaemia inhibitory factor stimulates glucose transport in isolated cardiomyocytes and induces insulin resistance after chronic exposure. *Diabetologia* **49**, 724-731, doi:10.1007/s00125-006-0150-6 (2006).
- 152 Kukielka, G. L. *et al.* Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. *Circulation* **92**, 1866-1875 (1995).
- 153 Gwechenberger, M. *et al.* Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation* **99**, 546-551 (1999).
- 154 Chandrasekar, B., Mitchell, D. H., Colston, J. T. & Freeman, G. L. Regulation of CCAAT/Enhancer binding protein, interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp130 expression during myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* **99**, 427-433 (1999).
- 155 Yamauchi-Takahara, K. *et al.* Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. *Circulation* **91**, 1520-1524 (1995).
- 156 Xing, Z. *et al.* IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *The Journal of clinical investigation* **101**, 311-320, doi:10.1172/JCI1368 (1998).
- 157 Roca, H. *et al.* CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *The Journal of biological chemistry* **284**, 34342-34354, doi:10.1074/jbc.M109.042671 (2009).
- 158 Frisdal, E. *et al.* Interleukin-6 protects human macrophages from cellular cholesterol accumulation and attenuates the proinflammatory response. *The Journal of biological chemistry* **286**, 30926-30936, doi:M111.264325 10.1074/jbc.M111.264325 (2011).
- 159 Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation* **117**, 175-184, doi:10.1172/JCI29881 (2007).
- 160 Odegaard, J. I. *et al.* Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* **447**, 1116-1120, doi:10.1038/nature05894 (2007).
- 161 van Hall, G. *et al.* Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **88**, 3005-3010, doi:10.1210/jc.2002-021687 (2003).
- 162 Hansen, D. *et al.* Plasma adipokine and inflammatory marker concentrations are altered in obese, as opposed to non-obese, type 2 diabetes patients. *European journal of applied physiology* **109**, 397-404, doi:10.1007/s00421-010-1362-5 (2010).

- 163 Vozarova, B. *et al.* Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obesity research* **9**, 414-417, doi:10.1038/oby.2001.54 (2001).
- 164 Kern, P. A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L. & Ranganathan, G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **280**, E745-751 (2001).
- 165 Senn, J. J. *et al.* Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* **278**, 13740-13746, doi:10.1074/jbc.M210689200 (2003).
- 166 Starkie, R., Ostrowski, S. R., Jauffred, S., Febbraio, M. & Pedersen, B. K. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 884-886, doi:10.1096/fj.02-0670fje (2003).
- 167 Bonner, F. *et al.* Ecto-5'-nucleotidase on immune cells protects from adverse cardiac remodeling. *Circulation research* **113**, 301-312, doi:CIRCRESAHA.113.300180 10.1161/CIRCRESAHA.113.300180 (2013).
- 168 Perregaux, D. & Gabel, C. A. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *The Journal of biological chemistry* **269**, 15195-15203 (1994).
- 169 Trepicchio, W. L., Bozza, M., Pedneault, G. & Dorner, A. J. Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production. *J Immunol* **157**, 3627-3634 (1996).
- 170 Ghosh, J. & Myers, C. E. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 13182-13187 (1998).
- 171 Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. & Davies, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical journal* **324 ( Pt 1)**, 1-18 (1997).
- 172 Halliwell, B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS letters* **411**, 157-160 (1997).
- 173 Chopra, S. & Wallace, H. M. Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species. *Biochemical pharmacology* **55**, 1119-1123 (1998).
- 174 Ames, B. N., Shigenaga, M. K. & Hagen, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 7915-7922 (1993).
- 175 Beckman, J. S. & Koppenol, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American journal of physiology* **271**, C1424-1437 (1996).
- 176 Buttke, T. M. & Sandstrom, P. A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology today* **15**, 7-10, doi:10.1016/0167-5699(94)90018-3 (1994).
- 177 Wiseman, H. & Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Biochemical journal* **313 ( Pt 1)**, 17-29 (1996).
- 178 Almand, B. *et al.* Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* **166**, 678-689 (2001).
- 179 Nagaraj, S. & Gabrilovich, D. I. Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research* **68**, 2561-2563, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6229 (2008).
- 180 Nagaraj, S. & Gabrilovich, D. I. Myeloid-derived suppressor cells in human cancer. *Cancer journal* **16**, 348-353, doi:10.1097/PPO.0b013e3181eb3358 (2010).
- 181 Nagaraj, S., Schrum, A. G., Cho, H. I., Celis, E. & Gabrilovich, D. I. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* **184**, 3106-3116, doi:10.4049/jimmunol.0902661 (2010).

- 182 Bronte, V. & Zanovello, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature reviews. Immunology* **5**, 641-654 (2005).
- 183 Bonavida, B. & Garban, H. Nitric oxide-mediated sensitization of resistant tumor cells to apoptosis by chemo-immunotherapeutics. *Redox Biol* **6**, 486-494, doi:10.1016/j.redox.2015.08.013 (2015).
- 184 Messmer, U. K., Reed, U. K. & Brune, B. Bcl-2 protects macrophages from nitric oxide-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **271**, 20192-20197 (1996).
- 185 Dhiman, M. *et al.* Increased myeloperoxidase activity and protein nitration are indicators of inflammation in patients with Chagas' disease. *Clinical and vaccine immunology : CVI* **16**, 660-666, doi:10.1128/CVI.00019-09 (2009).
- 186 Lu, T. & Gaborilovich, D. I. Molecular pathways: tumor-infiltrating myeloid cells and reactive oxygen species in regulation of tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* **18**, 4877-4882, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2939 (2012).
- 187 Armutcu, F., Ataymen, M., Atmaca, H. & Gurel, A. Oxidative stress markers, C-reactive protein and heat shock protein 70 levels in subjects with metabolic syndrome. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **46**, 785-790, doi:10.1515/CCLM.2008.166 (2008).
- 188 Holvoet, P. *et al.* The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort. *Diabetes* **53**, 1068-1073 (2004).
- 189 Hu, F. B. *et al.* Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. *The New England journal of medicine* **351**, 2694-2703, doi:10.1056/NEJMoa042135 (2004).
- 190 Isomaa, B. *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes care* **24**, 683-689 (2001).
- 191 Lakka, H. M. *et al.* The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *Jama* **288**, 2709-2716 (2002).
- 192 Lakka, H. M., Lakka, T. A., Tuomilehto, J. & Salonen, J. T. Abdominal obesity is associated with increased risk of acute coronary events in men. *European heart journal* **23**, 706-713, doi:10.1053/euhj.2001.2889 (2002).
- 193 Lakka, H. M., Salonen, J. T., Tuomilehto, J., Kaplan, G. A. & Lakka, T. A. Obesity and weight gain are associated with increased incidence of hyperinsulinemia in non-diabetic men. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **34**, 492-498, doi:10.1055/s-2002-34788 (2002).
- 194 Patrono, C. & FitzGerald, G. A. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **17**, 2309-2315 (1997).
- 195 Holvoet, P. *et al.* Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **21**, 844-848 (2001).
- 196 Brennan, M. L. *et al.* Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *The New England journal of medicine* **349**, 1595-1604, doi:10.1056/NEJMoa035003 (2003).
- 197 Davi, G., Falco, A. & Patrono, C. Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxidants & redox signaling* **7**, 256-268, doi:10.1089/ars.2005.7.256 (2005).
- 198 Martin-Gallan, P., Carrascosa, A., Gussinye, M. & Dominguez, C. Estimation of lipoperoxidative damage and antioxidant status in diabetic children: relationship with individual antioxidants. *Free radical research* **39**, 933-942, doi:10.1080/10715760500156751 (2005).
- 199 Ceriello, A., dello Russo, P., Amstad, P. & Cerutti, P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes* **45**, 471-477 (1996).

- 200 Du, X. L. *et al.* Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 12222-12226, doi:10.1073/pnas.97.22.12222 (2000).
- 201 Rabini, R. A. *et al.* Increased susceptibility to lipid oxidation of low-density lipoproteins and erythrocyte membranes from diabetic patients. *Metabolism: clinical and experimental* **43**, 1470-1474 (1994).
- 202 Dandona, P. *et al.* Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* **347**, 444-445 (1996).
- 203 Evans, J. L., Maddux, B. A. & Goldfine, I. D. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxidants & redox signaling* **7**, 1040-1052, doi:10.1089/ars.2005.7.1040 (2005).
- 204 Houstis, N., Rosen, E. D. & Lander, E. S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* **440**, 944-948, doi:10.1038/nature04634 (2006).
- 205 Russell, A. P. *et al.* Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: a case of good vs. bad lipids? *FEBS letters* **551**, 104-106 (2003).
- 206 Pinto, A. R., Chandran, A., Rosenthal, N. A. & Godwin, J. W. Isolation and analysis of single cells from the mouse heart. *J Immunol Methods* **393**, 74-80, doi:S0022-1759(13)00104-X 10.1016/j.jim.2013.03.012 (2013).
- 207 Weischenfeldt, J. & Porse, B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH protocols* **2008**, pdb prot5080, doi:10.1101/pdb.prot5080 (2008).
- 208 Piron, M. *et al.* Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta tropica* **103**, 195-200, doi:S0001-706X(07)00156-8 10.1016/j.actatropica.2007.05.019 (2007).
- 209 Mary, V. S., Theumer, M. G., Arias, S. L. & Rubinstein, H. R. Reactive oxygen species sources and biomolecular oxidative damage induced by aflatoxin B1 and fumonisin B1 in rat spleen mononuclear cells. *Toxicology* **302**, 299-307, doi:10.1016/j.tox.2012.08.012 (2012).
- 210 Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual review of immunology* **22**, 745-763, doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702 (2004).