

# Instituto de Microbiología y Parasitología Médica

## IMPAM (CONICET-UBA)

Cátedra de Microbiología  
Departamento de Microbiología, parasitología e Inmunología

### PROYECTO/S DE INVESTIGACIÓN

**Evaluación de marcadores inmunológicos detectados en la infección experimental con *Trypanosomacruzi* como biomarcadores predictores de la evolución clínica de la enfermedad de Chagas en individuos infectados.**

### REQUERIMIENTOS

- Buena predisposición para el trabajo en equipo
- Dedicación y motivación
- Voluntad para autogestionar tareas de manera independiente
- Conocimiento básico de microbiología, biología molecular y fisiología
- Poseer habilidades computacionales y lingüísticas que le permitan desenvolverse en las tareas y ámbitos correspondientes

DOCENTE: Dra. Catalina Dirney Alba Soto.

UBICACIÓN: Piso 13, Paraguay 2155

### TAREAS A REALIZAR POR PARTE DEL PRACTICANTE

- Realizar el seguimiento de la infección crónica por *Trypanosomacruzi* en un modelo murino
- Administrar fármacos inmunosupresores
- Evaluar carga parasitaria en sangre y tejidos por qPCR
- Evaluar parámetros inmunológicos por inmunomarcación y citometría de flujo
- Análisis de los datos, tratamiento estadístico y presentación de resultados.

### PROGRAMA DE FORMACIÓN DEL PRACTICANTE

#### OBJETIVOS A CUMPLIR POR PARTE DEL PRACTICANTE

Que el practicante adquiera habilidades pertinentes al desarrollo del pensamiento científico, manejo de técnicas de mesada, análisis de resultados, presentación de datos, exposición de resultados con manejo de bibliografía.

CARGA HORARIA: 12 hora

#### Objetivo 1:

**A. Rol de la IL-10 en la activación y mantenimiento de LT CD8+:** Con este objetivo nos planteamos determinar el fenotipo de los LT CD8+ pobremente expandidos y las consecuencias de este fenómeno en órganos linfoides secundarios y en órganos blanco (cuádriceps y corazón).

En el modelo de infección experimental con el protozoo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), encontramos una mayor morbilidad y un menor control de parásitos en ratones con deficiencia de IL-10 (IL-10 KO) en comparación con los ratones de tipo salvaje (WT). A pesar de la función mejorada de los macrófagos y la activación de las células dendríticas, los ratones IL-10 KO fueron más susceptibles a la infección. La cinética de linfocitos T (LT) en el bazo y la sangre periférica reveló que los ratones IL-10 KO infectados no lograron aumentar la cantidad de LT CD8+ esplénicos y circulantes totales, un fenómeno observado desde la segunda semana de infección en ratones WT. Los LT CD8+ totales de ratones IL-10 KO exhibieron una proliferación disminuida, potencial citotóxico y producción de IFN- $\gamma$  que sus contrapartes WT y LT CD8+ específicas de *T. cruzi* mostraron una citotoxicidad in vivo reducida. La ausencia de IL-10 afectó selectivamente la expansión, la supervivencia y el aumento de la expresión de PD-1 de LT CD8+ sin alterar estos mismos parámetros en las células T CD4+. El aumento de la expresión de los receptores inhibitorios y la modulación descendente de T-bet por las LT CD8+ de ratones infectados con IL-10 KO fueron compatibles con un fenotipo de agotamiento de LT. En conjunto, estos hallazgos revelan que durante la infección aguda, IL-10 desempeña un papel estimulante no reconocido previamente en las LT CD8+ la población de linfocitos más relevante para el control de las etapas intracelulares de *T. cruzi*. Un conocimiento claro de los mecanismos subyacentes que impulsan las funciones efectoras de LT citotóxicos es fundamental para comprender la persistencia del patógeno y el diseño racional de estrategias profilácticas contra *T. cruzi*.

Parte de estos resultados fueron publicados : IL-10 participates in the expansion and functional activation of CD8+ T cells during acute infection with *Trypanosoma cruzi*. Pino Martínez Agustina M., Miranda Cristian G., Batalla Estela I., González Cappa Stella M., **Alba Soto Catalina D.** J Leukoc Biol. 2019 Jan;105(1):163-175. doi: 10.1002/JLB.3A0318-111RR. Epub 2018 Oct 29.

Y presentados en: "XII Congress of the Latin American Association of Immunology & XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology". ALAI, Mayo 2018. Cancún. México. Agustina M. Pino-Martínez, Cristian G. Miranda, Estela Batalla, Stella M. Gonzalez-Cappa, **Catalina D Alba Soto**.

A role for IL-10 in the expansion and functional activation of CD8+ T cells during acute *Trypanosoma cruzi* infection.

#### **B. Papel de la IL-10 en la migración de LT CD8+:**

Lo que hemos publicado hace referencia principalmente a los LTCD8+ esplénicos pero tambien avanzamos en el estudio de las consecuencias de la ausencia de expansión de esta población en órganos linfoideos sobre su migración hacia órganos blanco de la infección y el control parasitario en los mismos. Estos resultados hacen parte de la tesis de Cristian Miranda (Química Biológica, FCEyN, UBA)que se encuentra en proceso de redacción y de un manuscrito también en proceso de redacción.

Nuestros resultados muestran que IL-10 participa en el "homing" de linfocitos hacia los tejidos blanco de la infección por *T. cruzi*. Aunque en ausencia de IL-10 se registra una mayor inflamación tejidos cardíaco y musculo esquelético, se observa una menor migración de esplenocitos totales hacia órganos blanco de daño. Cuando se analizan los

LT CD8+ en particular se registra una migración diferencial según el órgano analizado. Así, aquellos provenientes de ratones IL-10 KO migran en menor cuantía a corazón que los WT y lo opuesto se observa en el cuádriceps. A su vez, esto se relaciona con un menor control de la carga parasitaria en el primer órgano comparado con el segundo. Las quemoquinas CXL9 y CXL10 están sobreexpresadas en cuádriceps y corazón de ratones infectados IL-10 KO cual se condice con la mayor inflamación de éstos con respecto a los WT. Pero cuando analizamos CCL5 (cuyo receptor CCR5 se encuentra significativamente sobreexpresado en LTCD8+ esplénicos de ratones IL-10 KO) encontramos que la ausencia de IL-10 conduce a su sobreexpresión respecto del WT en cuadriceps pero no en corazón lo que coincidiría con la migración diferencial de LTCD8+ y control parasitario en los distintos órganos. De estos resultados concluimos que la migración de LTCD8 esplénicos cumple un papel importante en el control de *T. cruzi* en los órganos infectados y que existe una migración diferencial a órganos que probablemente esta orquestada por diferencias regionales en la expresión de CCL5. Futuros experimentos nos permitirán entender la relación de CCL5 en la migración diferencial a órganos de esta población linfocitaria.

Estos resultados hacen parte de la tesis doctoral de Cristian Gabriel Miranda pronta a ser presentada en FCEyN y de un manuscrito que está en proceso de redacción.

XXXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología. Mar del Plata. 13-16 de Noviembre de 2019.

Cristian Miranda, Agustina Pino-Martinez, Estela Batalla, Ernesto Gulin, Stella Maris Gonzalez Cappa, **Catalina Alba Soto**.

Impaired migration of CD8+ T cells and poor parasite control in target tissues of IL-10 deficient mice during acute *Trypanosoma cruzi* infection.

#### **C. Efecto de la administración de IL-10 recombinante en ratones IL-10KO:**

#### **D. Efecto de la ausencia de IL-10 durante la infección experimental con *T. cruzi* sobre el órgano blanco.**

Los experimentos para completar estos objetivos estaban en curso y se retomarán una vez podamos retomar actividades en el laboratorio.

#### **Objetivo 2:**

A- **Analizar la frecuencia de los polimorfismos del promotor del gen IL-10 en pacientes con infección crónica asintomáticos, con manifestaciones clínicas cardiológicas.**

En el estudio asociación entre polimorfismos funcional del gen IL-10 y la severidad de la enfermedad de Chagas hemos incluido en el protocolo de investigación a 121 pacientes de los cuales hemos obtenido los datos genotípicos y los datos clínico-epidemiológicos. Confeccionamos una base de datos para estudiar las asociaciones usando el programa SPSS. Al momento de la realización del informe final nos encontrábamos sumando pacientes al protocolo para obtener un mayor número de pacientes para el tratamiento estadístico de los datos. A raíz de la pandemia de COVID19 estamos considerando hacer un corte para analizar la asociación con los datos de pacientes que hasta ahora incluimos en el protocolo. Nuestros resultados parciales muestran que los SNPs del promotor de IL-10 son similares a los reportados en poblaciones caucásicas y americanas. Los genotipos

obtenidos para las 3 posiciones polimórficas son similares a los reportados en la literatura sin producirse nuevas variantes alélicas. La frecuencia de estos genotipos indica una composición particular de nuestra población que difiere de las de Brasil, España o Colombia. Resultados parciales también revelan una asociación entre la portación del genotipo ATA (que se asocia a una menor producción de IL-10) y la cardiopatía chagásica destacando el potencial de este biomarcador genético como marcador de susceptibilidad en los pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi*.

Para este objetivo seguimos trabajando con las Dras Marikena Risso y Silvia Repetto, médicos del servicio de Infectología y la división de Inmunoserología del Hospital de Clínicas y el cardiólogo Roberto N. Agüero del mismo hospital.

Los resultados parciales de este trabajo fueron presentados en el 17 Congreso Internacional de Medicina Interna del Hospital de Clínicas "José de San Martín" de la UBA. 14- 17 de agosto 2018. CABA. Aplicación de marcadores inmunológicos como herramientas predictoras de la evolución clínica de la enfermedad de Chagas. **Catalina D Alba Soto, Alicia Grijalva, Paula Ruybal, Roberto N Agüero, Analía Toledano, Lucía Gallo-Vaulet, Silvia Repetto, Marikena Risso.**

\* Este trabajo compitió por el premio a trabajos de investigación.

**B-Evaluar en los distintos grupos el perfil de respuesta inmune de los LT CD8+ periféricos y relacionarlos con polimorfismos del promotor del gen de IL-10 y/o los niveles de IL-10.**

**C-Definir un perfil inmunológico de riesgo de cardiopatía chagásica humana que puedan servir como biomarcadores en pacientes infectados:**

Los objetivos B y C no se han cumplido por dificultades para adquirir los insumos (kit de ELISA de captura para IL-10 humana) y panel de anticuerpos para evaluar el perfil de LT CD8+ circulantes. Hemos creado un biobanco serológico y de linfocitos periféricos criopreservados de estos pacientes para poder cumplir estos objetivos con futura financiación o el desembolso de subsidios que nos son adeudados (PIP 2015).

## **1. Plan de Investigación período 2021:**

**Evaluación de marcadores inmunológicos detectados en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi* como biomarcadores predictores de la evolución clínica de la enfermedad de Chagas en individuos infectados.**

### **2.1 Resumen**

Continuaremos investigando en enfermedad de Chagas con un enfoque traslacional de lo básico a lo clínico. En el periodo anterior comprobamos en el modelo murino el rol de IL-10 sobre la activación de LTCD8+ y el control de *T. cruzi* y avanzamos en establecer correlación entre polimorfismos funcionales de IL-10 y la susceptibilidad a la cardiopatía chagásica en individuos con serología positiva para *T. cruzi*. Además, comenzamos a estudiar la asociación entre la evolución de la enfermedad de Chagas en pacientes crónicos

que cursan también enfermedades autoinmunes y/o inmunosupresión. En el próximo periodo nos proponemos continuar estudiando en el modelo murino de infección por *T. cruzi* diferentes estrategias para revigorizar los LTCD8+ mediante la adición de IL-10 recombinante o disminución del estímulo antigenico. Esto contribuiría a mejorar las estrategias inmunoterapéuticas actualmente orientadas en potenciar la función células citotóxicas. Además, comenzaremos a estudiar la asociación entre tratamiento inmunosupresor y riesgo de reactivación en pacientes con infectados con *T. cruzi* cursando enfermedades autoinmunes. La actual pandemia de COVID19 impide predecir como continuaremos trabajando con pacientes y muestras clínicas pero hace relevante estudiar la incidencia y efecto de la coinfección SARS-COV2 y *T. cruzi* en nuestra cohorte de pacientes con enfermedad de Chagas.

## 2.2 Resumen en inglés

We will continue investigating Chagas disease with a translational focus from the basic to the clinical. In the previous period, we verified the role of IL-10 on the activation of LTCD8+ and the control of *T. cruzi*, and we advanced in establishing a correlation between functional polymorphisms of IL-10 and susceptibility to chagasic heart disease. Furthermore, we began to study the association between the evolution of Chagas disease in patients with positive serology for *T. cruzi* and the presence of autoimmune diseases and/or immunosuppression. In the next period, we intend to study in the murine model of *T. cruzi* infection different strategies to reenvigorate LTCD8+ by adding recombinant IL-10 or reducing the antigenic stimulus. This would contribute to improving the immunotherapeutic strategies currently aimed at enhancing cytotoxic cell function. In addition, we will begin to study the association between immunosuppressive treatment and risk of reactivation in patients with *T. cruzi* infection and autoimmune diseases. The current pandemic of COVID19 prevents us from predicting how we will continue working with patients and clinical samples, but it makes it relevant to study the incidence and effect of SARS-COV2 and *T. cruzi* coinfection in our cohort of patients with Chagas disease.

## 1.3 Objetivos e hipótesis de la investigación

En el próximo periodo continuaremos con las actividades propuestas en el plan original. Estudiaremos en el modelo murino de infección por *T. cruzi* diferentes estrategias para revigorizar los LTCD8+ mediante la adición de IL-10 recombinante o disminución del estímulo antigenico. Continuaremos sumando pacientes en nuestro protocolo de estudio de los polimorfismos de IL-10 y completando la base de datos. Además, comenzaremos a estudiar en el modelo murino la asociación entre tratamiento inmunosupresor y riesgo de reactivación de *T. cruzi*. La actual pandemia de COVID19 impide predecir como continuaremos trabajando con pacientes y muestras clínicas pero hace relevante estudiar la incidencia y efecto de la coinfección SARS-COV2 y *T. cruzi* en nuestra cohorte de pacientes con enfermedad de Chagas. En lo que sigue hablaremos de los nuevos objetivos propuestos para la extensión del proyecto.

**Objetivo 3. Evaluar experimentalmente la reactivación parasitaria causada por fármacos inmunosupresores convencionales y dirigidos a blancos definidos:** La literatura científica consultada y nuestra experiencia nos permiten postular que, entre los

pacientes con enfermedades autoinmunes bajo tratamiento inmunosupresor, el riesgo de reactivación de *T. cruzi* está asociado al tipo de tratamiento farmacológico administrado. Siendo un escenario diferente al de individuos con trasplante de órgano sólido o SIDA el monitoreo de la reactivación debería ser ajustado al tipo de tratamiento inmunosupresor recibido. Los algoritmos de monitoreo de reactivación de *T. cruzi* de pacientes con enfermedades autoinmunes sometidos a tratamiento inmunosupresor deben ser establecidos separadamente al de los individuos con infección por HIV, transplantados o con enfermedades oncohematológicas. Los modelos experimentales que estudian la reactivación de la enfermedad pueden permitirnos ampliar nuestro conocimiento de las alteraciones tanto en la progresión de la enfermedad como en el manejo clínico de la enfermedad (Perez et al, 2015). El modelo de infección murina con *T. cruzi* brindará la posibilidad **de evaluar experimentalmente la reactivación parasitaria causada por fármacos inmunosupresores convencionales y dirigidos a blancos definidos no solo a nivel sanguíneo sino en tejidos.** En este modelo podemos diseñar experimentos que estudien el efecto de fármacos inmunosupresores sobre la evolución de la parasitosis, del daño en órgano blanco y de marcadores inmunológicos que tengan una validez predictiva preclínico factible de trasladarse al estudio de la situación frente al paciente. A su vez, **estudiar si la supresión de blancos moleculares con efecto directo sobre vías de señalización y cascadas efectoras definidas de la respuesta inmune modifica la carga parasitaria es de interés para comprender cuales son los factores inmunológicos críticos para el control parasitario.**

Por esto el nuevo objetivo de nuestro proyecto es **desarrollar un modelo experimental preclínico que permita comprender el riesgo de reactivación de *T. cruzi* según el mecanismo de acción del tratamiento inmunosupresor.**

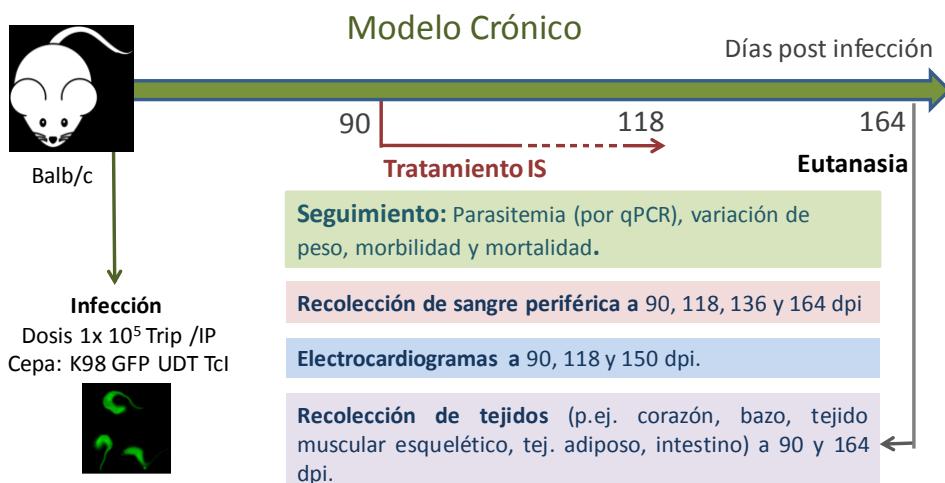
**Metodología:** Para cumplir con este objetivo se emplearán modelos de infección experimental que se ha establecido en nuestro laboratorio y se esquematiza en la figura.

**a. Modelo de infección crónica:** Este modelo refleja con mayor fidelidad lo que sucede en las personas infectadas crónicamente donde los componentes de la respuesta adaptativa humoral y celular acantonan los parásitos en tejidos como nidos de amastigotes (Taylor et al, 2019) y eventualmente en estadios durmientes (Sanchez-Valdez et al, 2019). En este modelo, que se describe en la figura 4, a los 90 dpi ya no se detectan parásitos en circulación por microscopía convencional (Ver figura 4, resultados preliminares) y los ratones entran en la fase crónica de la enfermedad. Aquí podemos evaluar distintos parámetros en ratones con y sin tratamiento inmunosupresor.

Al igual que con los pacientes vamos a evaluar fluctuaciones de la **parasitemia por métodos moleculares (qPCR)** en micromuestras obtenidas por extracción en animal vivo. También, a partir de estas muestras de sangre periférica, evaluaremos **parámetros inmunológicos por citometria de flujo** (p.ej. poblaciones celulares, marcadores funcionales) y **citoquinas séricas** por Elisa de captura.

A punto final, compararemos en ratones no tratados y tratados con fármacos inmunosupresores la **carga parasitaria** por qPCR en distintos tejidos blancos de daño o reservorios de la enfermedad. Realizaremos **un estudio histopatológico de tejidos blanco de daño** para evaluar si eventuales reactivaciones de la carga parasitaria causada

por el tratamiento inmunosupresor tienen un efecto en los tejidos blanco de daño de *T. cruzi*. Como un parámetro relacionado con esto vamos a efectuar **estudios electrocardiográficos** en ratones a distintos tiempos post seguimiento (estos estudios se realizarán mediante una colaboración establecida con los Dr. Bruno Buchholz y Ricardo Gelpi en el Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA).



**b. Tratamiento con fármacos inmunosupresores:** Para este periodo seleccionaremos para el modelo experimental 4 fármacos inmunosupresores convencionales y 3 no convencionales de uso mas frecuente para artritis reumatoidea y otras enfermedades autoinmunes. El esquema de tratamiento se dará en base semanal (al menos 4 semanas para el modelo crónico) según la tabla a continuación.

Fármaco	Mecanismo de acción/ Blanco	Dosis semanal	Vía	Referencia
<b>Fármacos convencionales</b>				
Methotrexate	Inhibe síntesis acídos nucléicos	0,5-5 mg/kg/día	IP	Riehl et al, 2017
Leflunomida	Inhibe síntesis acídos nucléicos	2-5-10mg/kg/cada 48 hs	oral	Elshaer et al, 2019
Ciclofosfamida	Disruptor DNA	200 mg/kg; uni dosis	IP	Riehl et al, 2017
Hidroxiquinolona	Citotóxica	60 mk/kg; semanal	IP	Ruiz et al, 2016
Sulfasalazine	Inmunomodulador	10 mg/kg; 2 x semana	IP	Cha et al, 2015
Micofenolato Mofetil	Inhibe síntesis acídos nucléicos	40 mg/kg/día	oral	Riehl et al, 2017
Azathioprine	Inhibe síntesis acídos nucléicos	1 mg/kg/día	oral	Riehl et al, 2017
Tacrolimus	Inhibe calcineurina	1mg/kg/día	oral	Riehl et al, 2017
<b>Anticuerpos monoclonales</b>				
Infliximab	TNF-alfa	3 mg/kg; 3x semana	IP	Perez et al, 2009
Etanercept	TNF-alfa	2.5 mg/kg; 2x IP		Bilate et al,

Abatacept	CTLA4	semana 5mg/kg /día	IP	2007 Riehl et al, 2017
Anakinra	IL-1	25 mg/kg	IP	Gorelik et al, 2019
Rituximab/IgG 2a anti-CD20 mAb	CD20	250 ug/ ratón	IV	Marino et al, 2016
Tocilizumab	IL-6	8 mg/kg; semanal	IP	Kamiya et al, 2019
<b>Pequeña molécula inhibidora</b>				
Tofacitinib	Janus kinase	20 mg/kg; 3 x sem	IP	Sendo et al, 2019

**c. Parámetros parasitológicos a evaluar:**

- **Parasitemia:** Se medirá en muestras de sangre periférica extraída de la vena dorsal de la cola del ratón como hemos descripto previamente(Pino-Martinez et al. 2019).
- **Morbilidad y sobrevida:** registraremos evolución del peso, signos como piloerección y cambios posturales y haremos eutanasia humanitaria ante la aparición de síntomas de sufrimiento severo (The 3Rs , 2019).
- **Carga parasitaria en tejidos y sangre:** Será cuantificada por PCR en tiempo real a partir de ADN extraído de estos tejidos según la metodología previamente empleada por nosotros (Batalla et al, 2013 y Sbaraglini et al, 2016 y 2019). Alternativamente, estamos poniendo a punto un método basado en citometría de flujo y recuento absoluto con microesferas fluorescentes para cuantificar parásitos K98 GFP en sangre.

**d. Análisis estadístico:** Los resultados serán expresados como media ± error estándar de la media (EE). Para las comparaciones entre múltiples grupos se empleará el test de Análisis de Varianza (ANOVA) seguido del post- test de Bonferroni para determinar las diferencias significativas ( $p <0.05$ ). Todos los valores serán obtenidos utilizando los programas GraphPad Prism 8.

**Objetivo 4. Coinfección con SARS-Cov2 y *T. cruzi*, incidencia y consecuencias de la co-infección sobre la evolución del COVID 19 y la enfermedad de Chagas.**

Tras la pandemia y la potencial exposición al nuevo coronavirus de los pacientes crónicamente infectados con *T. cruzi* de nuestras cohortes de estudio en el Hospital de Clínicas Jose de San Martín han sido un obstáculo para la continuidad de los proyectos de investigación clínica en los que trabajamos. Dado que se trata de un nuevo patógeno no existe información acerca de las consecuencias de la infección crónica previa por *T. cruzi* (cuya persistencia altera de determinada manera la respuesta inmune). Cuando regrese la actividad asistencial habitual será de interés evaluar la presencia de títulos de anticuerpos contra SARS Cov2, interrogar sobre los eventuales signos y síntomas de COVID 19 y hacer un seguimiento de las eventuales modificaciones del curso de la enfermedad de Chagas o de la patología autoinmune de base. Este estudio requerirá de la aprobación del comité de ética que gestionaremos oportunamente.

## 2.4 Antecedentes en la temática

### Enfermedades autoinmunes e inmunosupresión en pacientes con serología positiva para la enfermedad de Chagas:

Realizamos un análisis de los datos clínicos de pacientes que acudieron al servicio de Infectología del Hospital de Clínicas con infección crónica con *T. cruzi* y enfermedades de base causantes de inmunocompromiso o que requirieron para su tratamiento algún fármaco inmunosupresor. A partir de los datos de las historias clínicas describimos las características epidemiológicas y clínicas de esta población de pacientes inmunocomprometidos con riesgo de infección activa por *T. cruzi*. Adicionalmente, estudiamos la asociación entre las diferentes condiciones inmunosupresoras y el desarrollo de daño de órgano blanco.

**Metodología:** Se realizó un estudio transversal en pacientes inmunocomprometidos con enfermedades autoinmunes e infección con *T. cruzi*. Se analizaron datos demográficos, enfermedad base y tratamiento inmunosupresor. Se definió infección crónica por *T. cruzi* a la presencia de reactividad de dos técnicas serológicas. En la primera consulta se solicitó ECG, radiografía de tórax y ecocardiograma y métodos parasitológicos (Strout y carga parasitaria por PCR en tiempo real, qPCR). El seguimiento, para detección de reactivación parasitaria, se realizó a los 15 días y luego cada 3-6 meses de iniciado el tratamiento inmunosupresor. Se definió reactivación parasitaria a la visualización del parásito en sangre periférica o a la detección de al menos 1 genoma parasitario por ml de sangre por qPCR ( $Ct < 34$ ). Los pacientes se clasificaron según presencia/ausencia de patología demostrable (Consenso de Enfermedad de Chagas, SAC, 2011). Se estimaron las estadísticas descriptivas de tendencia central. Las variables se expresaron en términos de frecuencias y porcentajes.

Las asociaciones entre drogas inmunosupresoras y reactivación y entre la enfermedad de base y el riesgo de daño en órgano blanco se evaluaron en un análisis multivariado calculando el Odds Ratio (OR). Los intervalos de confianza (IC) se estimaron para un nivel de 95%. Una  $p < 0,05$  se consideró significativa. Se utilizó el programa Microsoft SPSS.

#### **Tabla 1. Características demográficas y clínicas de la población objeto de estudio.**

**Número de pacientes en estudio:** 41

**Media de edad:** 55 años ( $SD \pm 11,6$ , rango 17-74)

**Sexo femenino:** 58,5%

**Procedencia:** Argentina (78%)

Bolivia (17,1%)

Paraguay (4,9%)

**Bajo tratamiento con fármacos inmunsupresores:** 70.7%

**Pacientes con cardiopatía chagásica:** 15,8%

**Infección activa:** 11 pacientes

Reactivaciones: 8

Primo-infecciones: 3

**Presentación clínica:** Asintomáticos: 8

Encefalitis: 2

Miocarditis: 1

**Strout positivo:** 66,7% de las primoinfecciones

50% de reactivaciones

**qPCR positiva:** 100% de los pacientes con infección activa.

**Carga parasitaria mediana:** 22 parásitos /ml. Rango intercuartil: 232

**Resultados:** En nuestra cohorte contamos de pacientes con diferentes causales de inmunosupresión la reactivación parasitaria fue baja. La primoinfección de pacientes con trasplante de órgano sólido con donante positivo fue alta (75%). El análisis multivariado de fármacos asociados a infección activa mostró que el uso de micofenolato mofetil, bloqueante de la síntesis de novo de ácidos nucleicos y droga de primera línea en pacientes con trasplante renal, se asocia con un riesgo aumentado de infección activa (Tabla 2). Por su parte, en nuestra cohorte no se comprobó una asociación entre la infección activa y el uso de corticoides como tampoco de otros fármacos inmunosupresores. El número relativo de pacientes de nuestra cohorte con cardiopatía chagásica fue menor al de la población general. Sin embargo, discriminando por enfermedad de base encontramos una asociación entre la artritis reumatoidea y un riesgo aumentado de sufrir cardiopatía chagásica (Tabla 3). De este estudio preliminar destacamos que se debe realizar un seguimiento parasitológico riguroso de los pacientes que reciban tratamiento con micofenolato mofetil, droga que actualmente se para evitar el rechazo de órgano sólido transplantado, pero también en otras enfermedades autoinmunes como vasculitis y miositis.

**Tabla 2. Análisis multivariado de factores asociados a infección activa**

	Odds Ratio	IC (95%)	P
Droga inmunosupresora			
<b>Micofenolato mofetil</b>	<b>1,67</b>	<b>1,00-2,43</b>	<b>0,02</b>
Corticosteroides	1,77	0,391-8,08	0,35

**Tabla 3. Análisis multivariado de factores asociados a cardiopatía**

	Odds Ratio	IC (95%)	P
Enfermedad de Base			
<b>Artritis reumatoidea</b>	<b>6,75</b>	<b>1.03-43,87</b>	<b>0,048</b>
Otras enfermedades autoinmunes	0,83	0,72-0,96	0,356
VIH (<200 CD4+)	2,13	0,18-24,71	0,483
Enf. oncohematológicas	0,57	0,59-5,65	0,541

**Conclusiones:** Este estudio preliminar nos permitió corroborar datos que se encuentran en la literatura acerca del riesgo elevado de reactivación de la infección por *T. cruzi* en individuos VIH positivos con un recuento de CD4 inferior a 200 y en individuos con trasplante de órgano bajo tratamiento inmunosupresor severo para evitar el rechazo del órgano. A su vez, este estudio permitió comprobar que en nuestra cohorte el riesgo de reactivación es bajo en pacientes con enfermedades autoinmunes que reciben fármacos inmunosupresores convencionales. Dada la diversidad de esquemas terapéuticos actualmente en uso es importante comprender si este riesgo sigue siendo bajo en presencia de fármacos inmunosupresores a blanco definido.

Este trabajo fue presentado en:

XXX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología – 13 de Noviembre del 2018 – Resistencia, Chaco. Goncalves Valente C.M, Sierra M. , Paravano L. , Toledano A. , Gallo Vaulet L. , Aguero R.N. , Bogdanovitz E. , Ruybal P. , Risso M.G., Repetto S.A., **Alba Soto C.**D. Enfermedad De Chagas En Inmunosuprimidos: Evaluación De Riesgo De Infección Activa Y Desarrollo De Daño De Órgano Blanco.

XIX Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología. Tucumán del 9 al 11 de Mayo, 2019. Paravano L; Sierra M ; Gallo Vaulet L ; Toledano A ; Sosa D ; Stecher D ; Repetto S ; **Alba Soto C.** Reactivación y daño de órgano blanco en pacientes con infección crónica por *Trypanosoma cruzi* y patologías autoinmunitarias.

## 2.5 Cronograma de actividades

Actividad	Meses año 2021											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Objetivo 1.C. Efecto de la administración de IL-10 recombinante en ratones IL-10KO:												
Objetivo 1.D. Efecto de la ausencia de IL-10 durante la infección experimental con <i>T. cruzi</i> sobre el órgano blanco:												
Objetivo 2. Asociación entre polimorfismos del promotor del gen IL-10 en pacientes con infección crónica y cardiopatía chagásica.												
Objetivo 3. Evaluar experimentalmente la reactivación parasitaria causada por fármacos inmunosupresores convencionales y dirigidos a blancos definidos:												
Objetivo 4. Coinfección con SARS-Cov2 y <i>T. cruzi</i> , incidencia y consecuencias de la co-infección sobre la evolución del COVID 19 y la enfermedad de Chagas.												

## 2.6 Bibliografía:

- Almeida EA, Ramos Júnior AN, Correia D, Shikanai-Yasuda MA. Co-infection *Trypanosoma cruzi/HIV*: systematic review (1980-2010). Rev Soc Bras Med Trop. 2011 Nov-Dec;44(6):762-70.
- González-Ramos J, Alonso-Pacheco ML, Mora-Rillo M, Herranz-Pinto P. Need to screen for Chagas disease and Strongyloides infestation in non-endemic countries prior to treatment with biologics. Actas Dermosifiliogr. 2017 May;108(4):373-375. doi: 10.1016/j.ad.2016.10.013. Epub 2017 Jan 30.
- Lattes R, Lasala MB. Chagas disease in the immunosuppressed patient. Clin Microbiol Infect. 2014 Apr;20(4):300-9. doi: 10.1111/1469-0691.12585.
- Martinez-Perez A, Norman FF, Monge-Maillo B, Perez-Molina JA, Lopez-Velez R. An approach to the management of *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas' disease) in immunocompromised patients. Expert Rev Anti Infect Ther. 2014 Mar;12(3):357-73. doi: 10.1586/14787210.2014.880652.

- Nogueira SS, Felizardo AA, Caldas IS, Gonçalves RV, Novaes RD. Challenges of immunosuppressive and antitrypanosomal drug therapy after heart transplantation in patients with chronic Chagas disease: A systematic review of clinical recommendations. *Transplant Rev (Orlando)*. 2018 Jul;32(3):157-167. doi: 10.1016/j.trre.2018.04.003.
- Pinazo MJ, Espinosa G, Cortes-Lletget C, Posada Ede J, Aldasoro E, Oliveira I, Muñoz J, Gállego M, Gascon J. Immunosuppression and Chagas disease: a management challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e1965. doi: 10.1371/journal.pntd.0001965.
- Pinazo MJ, Espinosa G, Gállego M, López-Chejade PL, Urbina JA, Gascón J. Successful treatment with posaconazole of a patient with chronic Chagas disease and systemic lupus erythematosus. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Apr;82(4):583-7. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0620.
- Sartori AM, Ibrahim KY, Nunes Westphalen EV, Braz LM, Oliveira OC Jr, Gakiya E, Lopes MH, Shikanai-Yasuda MA. Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. *Ann Trop Med Parasitol*. 2007 Jan;101(1):31-50.
- Vacas AS, Gomez-Santana LV, Torre AC, Galimberti RL. Reactivation of Chagas-Mazza disease during treatment with infliximab. *An Bras Dermatol*. 2017 Nov-Dec;92(6):899-900. doi: 10.1590/abd1806-4841.20177346.
- Kaushal M, Shabani S, Cochran EJ, Samra H, Zwagerman NT. Cerebral Trypanosomiasis in an Immunocompromised Patient: Case Report and Review of the Literature. *World Neurosurg*. 2019 Sep;129:225-231. doi: 10.1016/j.wneu.2019.05.260. Epub 2019 Jun 7.
- Martinez-Perez A, Norman FF, Monge-Maillo B, Perez-Molina JA, Lopez-Velez R. An approach to the management of *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas' disease) in immunocompromised patients. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014 Mar;12(3):357-73. doi: 10.1586/14787210.2014.880652.
- Chen YM, Yang SS, Chen DY. Risk-stratified management strategies for HBV reactivation in RA patients receiving biological and targeted therapy: A narrative review. *J Microbiol Immunol Infect*. 2019 Feb;52(1):1-8. doi: 10.1016/j.jmii.2017.10.002.
- Lim CC, Tan BH, Tung YT, Huang H, Hao Y, Mok IYJ1, Lee PH3, Choo JCJ1, Diehl R, Ferrara F, Müller C, Dreyer AY, McLeod DD, Fricke S, Boltze J. Immunosuppression for in vivo research: state-of-the-art protocols and experimental approaches. *Cell Mol Immunol*. 2017 Feb;14(2):146-179. doi: 10.1038/cmi.2016.39.
- Souza RM, Andrade HF Junior, Duarte MI, Braz LM, Schubach AO, Silva FC, Amato VS. **Reactivation** of cutaneous and mucocutaneous tegumentary leishmaniasis in rheumatoid arthritis patients: an emerging problem? *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2017 Apr 3;59:e6. doi: 10.1590/S1678-9946201759006.
- Fernández-Ruiz M. Assessment of latent infections in patients receiving biological therapies. *Rev Esp Quimioter* 2019;32 (Suppl. 2): 63-68.
- Repetto S, Ruybal P, Batalla E, López C, Fridman V, Sierra M, Radisic M, Bravo M, Risso M, González Cappa SM, Alba Soto CD. Strongyloidosis out of endemic areas: Long term parasitological and clinical follow-up after ivermectin treatment. *Clin Infect Dis*. 2018 Jan 19. doi: 10.1093/cid/cix1069.
- Repetto SA, Alba Soto CD, Cazorla SI, Tayeldin ML, Cuello S, Lasala MB, Tekiel VS, González Cappa SM. An improved DNA isolation technique for PCR detection of *Strongyloides stercoralis* in stool samples. *Acta Trop*. 2013 Feb 12;126(2):110-114.
- Repetto SA, Ruybal P, Solana ME, López C, Berini CA, Alba Soto CD, Cappa SM. Comparison between PCR and visualization larvae methods for diagnosis of *Strongyloides stercoralis* out of endemic area: A proposed algorithm. *Acta Trop*. 2016 Feb 8;157:169-177. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.02.004.
- Perez CJ, Lymbery AJ, Thompson RCA. Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. *Trends Parasitol*. 2015 Nov;31(11):595-603. doi: 10.1016/j.pt.2015.06.006.

- Sánchez-Valdés F, Padilla A. In Situ Detection of Dormant *Trypanosoma cruzi* Amastigotes Using Bioluminescent-Fluorescent Reporters. Methods Mol Biol. 2019;1955:179-186. doi: 10.1007/978-1-4939-9148-8\_13.
- Taylor MC, Francisco AF, Jayawardhana S, Mann GS, Ward AI, Olmo F, Lewis MD, Kelly JM. Exploiting Genetically Modified Dual-Reporter Strains to Monitor Experimental *Trypanosoma cruzi* Infections and Host-Parasite Interactions. Methods Mol Biol. 2019;1955:147-163. doi: 10.1007/978-1-4939-9148-8\_11.
- Pino-Martínez AM, Miranda CG, Batalla EI, González-Cappa SM, Alba Soto CD. IL-10 participates in the expansion and functional activation of CD8+ T cells during acute infection with *Trypanosoma cruzi*. J Leukoc Biol. 2019 Jan;105(1):163-175. doi: 10.1002/JLB.3A0318-111RR. Epub 2018 Oct 29.
- Batalla EI, Pino Martínez AM, Poncini CV, Duffy T, Schijman AG, González Cappa SM, Alba Soto CD Impairment in natural killer cells editing of immature dendritic cells by infection with a virulent *Trypanosoma cruzi* population. J Innate Immun. 2013;5(5):494-504. doi: 10.1159/000350242.
- Sbaraglini ML, Bellera CL, Fraccaroli L, Larocca L, Carrillo C, Talevi A, Alba Soto CD. Novel cruzipain inhibitors for the chemotherapy of chronic Chagas disease. Int J Antimicrob Agents. 2016 Jul;48(1):91-95. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.02.018.
- Sbaraglini ML, Bellera CL, Quarroz Braghini J, Areco Y, Miranda C, Carrillo C, Kelly J, Buchholz B, Gelpi RJ, Talevi A, Alba Soto CD. Combined therapy with Benznidazole and repurposed drugs Clofazimine and Benidipine for chronic Chagas disease. Eur J Med Chem. 2019 Oct 10;184:111778. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111778.