



Universidad
Nacional
de Córdoba

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica Clínica



Tesis de doctorado en Ciencias Químicas

Efecto de la terapia con anti-CD20 sobre la respuesta de linfocitos T CD8+

Análisis en el modelo de infección experimental con *Trypanosoma cruzi*

Bioquímico Facundo Fiocca Vernengo

Córdoba-Argentina, 2018

Directora de tesis:

Dra. Adriana Gruppi.....

Comisión asesora:

Dra. Beatriz Caputto.....

Dra. Andrea Ropolo.....

Dra. Cinthia Stempin.....

Evaluadora externa:

Dra. Susana Laucella.....

Este trabajo de tesis fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT-UNC), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FonCyT) y el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (National Institute of Health - NIH).

AGRADECIMIENTOS

Una etapa se termina, y si miro atrás, un bosque lleno de árboles se dibuja sobre el camino que recorrí. Este bosque se llama Facultad de Ciencias Químicas, sitio al cual aprendí a amar tanto como a la ciudad que ella abarca. No puedo más que agradecerte las incontables herramientas que me has dado a lo largo de estos casi 12 años, y a través tuyo agradecer a todas las personas que sostienen la innegociable educación pública, laica, gratuita y de calidad que tenemos en la UNC.

Gracias a las personas a cargo de la dirección del consejo del DBC y del CIBICI. Sin su capacidad de frenarnos el viento y las tormentas que llegan al bosque, el tránsito por este camino sería mucho más complicado. Gracias también a la Adri B. y Ceci B. que con tanta paciencia me han resuelto muchísimos problemas.

Gracias a Adri G., ya que estando cerca tuyo nunca me faltó nada. Me acompañaste todo este tiempo y confiaste en mí siempre, me hiciste crecer como nadie antes lo había hecho, sin dejar de lado apoyo maternal que siempre tuviste hacia mí.

Gracias a la Eva y Caro, con quienes aprendí muchísimo. Valoro (junto con la Adri), todo el esfuerzo, la pasión y la dedicación que le ponen a este trabajo para que las/os grumitas/os podamos manearnos con mayor facilidad.

Gracias (de nuevo) a Adri, Eva, Horacio, Fabio, Pilar, Caro y Vicky por confiar en mi capacidad de guardabosques, dándome la posibilidad de acompañar el crecimiento de los árboles más pequeños a través de la docencia. Gracias a sus consejos y a la libertad que me dieron al momento de pararme frente a las/os alumnas/os hoy me siento mucho más seguro de mí mismo.

Gracias a esas ramas que me han nutrido a lo largo de estos años de doctorado. Empezando por aquellas que ya se trasplantaron en otros bosques como la queridísima Carito, con quien di mis primeros pasos; la Meli, a quien agradezco el acompañamiento que muchas veces me dio cuando las cosas se ponían difíciles; a la Jime, que fue una maestra siempre!; a la Ceci, que con sus sonrisas y su cariño siempre me hizo sentir en familia; al Fer, que en estos últimos años aprendí a quererlo como si fuese un hermano. Gracias a las ramas del gruma que aún siguen acá. Al generosísimo Cris que fue el mejor compañero que tuve dentro del laboratorio. Siempre me incentivaste y ayudaste incluso cuando los experimentos duraban más de 18 horas. Gracias Cin, que siempre estuviste presente para escuchar mis problemas (y por explicarle a la Lauri lo de la parasitemia). Gracias a la Laurita que me bancaste muchísimo en esta última etapa que fue difícil (y por no mandarme a la mierda cuando te hice contar parasitemias incluso cuando nunca lo habías hecho), y a la Yami por la paciencia que conlleva tener que lidiar con un compañero medio loco. Gracias a la Cotita que con su cuelgue único me ha sacado tantas sonrisas, y al Santi por ocuparse (y solucionar) tantas cosas dentro del laboratorio. Gracias a Taz (Sabri), que con tu energía y tus

bailes me contagiaste las ganas de tener pelo de nuevo (largo, obvio), y a la Carito por sus comentarios picantes.

Gracias a todas las otras personas de mi querido 103, con quienes he compartido tantos momentos dentro y fuera del laboratorio. A la Dani (Lauri) que voy a extrañar cuando me vaya, la Xime y sus mates en el p-103, la nueva Agus que no deja de pipetear, a mi querida beia beia beia Yami que adoro tanto!, a la Nati que siempre estará para retarme un poquito (aunque por dentro sé que me quiere igual que yo a ella), y a la simpática Belu. A las/os que ya no están en el lab: Gaylord de mi corazón, siempre tan poco conectado con el entorno; a Lilín que a esta altura ya será profesora emérita en Harvard, al Flaquín y su capacidad de relajación; a la Luisi y el Colo que nos encantaban con su belleza; a la Eli que era una confidente. Gracias a la Fer que siempre estuvo con un mate y una historia para contar.

Para terminar con el lab, agradezco al Emi, Pauli y Flor (104); Jime (cientonosecuanto); Cande (119) y Clau (ex09), con quienes compartí momentos muy lindos.

Finalmente, el camino en este bosque no pudo haber sido transitado sin esos hogares que me dieron el cariño y el sostén necesario para poder llegar al final. Por eso agradezco en primer lugar al hogar más grande y generoso que tengo, que es mi familia. Sobre todo a mis padres, que a pesar de no entender (casi) una palabra de lo que les explicaba siempre me apoyaron. Quiero agradecer a mi compañero de vida Agus Roth, que fue un pilar fundamental que me sostuvo incondicionalmente y sin pedir nada a cambio durante este tiempo y a través de él a mi segunda familia de Río Cuarto que me recibe siempre con los brazos abiertos. Agradezco también a mis amigas/os fuera del lab: Dindolondangos, Maxi, Sili, Ludmi, Juli, Pao, Stefi y a mis amigos de Misiones que a pesar de la distancia los tengo presentes siempre.

Ojalá el próximo bosque sea tan lindo como este, pero por las dudas sin que ustedes se hayan dado cuenta les robé un pedacito de cada una/o para no extrañarlas/os tanto.

GRACIAS, FACU.

INDICE

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS	i
RESUMEN	v
SUMMARY	vii
INTRODUCCIÓN	1
Linfocitos B	3
Generalidades de la respuesta de linfocitos B	3
Funciones independientes de la producción de anticuerpos: presentación antigénica.....	4
Funciones independientes de la producción de anticuerpos: secreción de factores solubles...	5
Terapias con fármacos biológicos inmunomoduladores	11
Generalidades	11
RTX: Anticuerpo monoclonal anti-CD20.....	11
Efectos adversos del tratamiento con RTX	12
Enfermedad de Chagas	13
Generalidades	13
Respuesta inmune adaptativa contra <i>T. cruzi</i>	14
Respuesta de linfocitos T CD8: generalidades y respuesta citotóxica antiparasitaria.....	15
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	21
Hipótesis.....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos.....	23
RESULTADOS I	25
Esquema de administración de α CD20 seguida de la infección experimental con <i>T. cruzi</i> en animales de experimentación.....	27
La administración de α CD20 produce una depleción de los linfocitos B que se profundiza en los animales infectados con <i>T. cruzi</i>	27
CONCLUSIONES I	33
RESULTADOS II	35
Evaluación del impacto de la ausencia de los linfocitos B en el control de la infección experimental con <i>T. cruzi</i>	37
En ausencia de los linfocitos B se observó una mayor replicación parasitaria en los tejidos blanco de la infección con <i>T. cruzi</i>	37
La respuesta de linfocitos T CD8+ total y específica para <i>T. cruzi</i> , se encontró disminuida en los animales administrados con α CD20	37

En ausencia de linfocitos B, la población de linfocitos T CD8+ presenta una disminución en la frecuencia de células efectoras	42
Los linfocitos T CD8+ de los animales carentes de linfocitos B presentan una menor proliferación y una mayor muerte celular	46
En ausencia de linfocitos B, los linfocitos T CD8+ presentaron un menor grado de activación celular y mayores niveles de expresión de receptores inhibitorios	47
En ausencia de linfocitos B se encontró una menor funcionalidad de los linfocitos T CD8+....	52
CONCLUSIONES II	59
RESULTADOS III	61
Estudio del mecanismo involucrado en promoción de la respuesta de linfocitos T CD8+ por parte de los linfocitos B.....	63
La respuesta citotóxica se encuentra afectada en los animales depletados de linfocitos B al día 12 dpi	63
En los ratones inyectados con α CD20 se observa una marcada disminución de células productoras de IL-6 e IL-17A	70
El tratamiento con IL-17A, pero no con IL-6, restaura la respuesta de los linfocitos T CD8+ en los animales depletados de linfocitos B	73
CONCLUSIONES III	83
DISCUSIÓN.....	85
MATERIALES Y MÉTODOS.....	99
Animales de experimentación.....	101
Reactivos	101
Parásitos e Infección	104
Tratamiento <i>in vivo</i> de ratones	105
Obtención de sangre y plasma	106
Obtención de las suspensiones celulares de diferentes órganos	107
Cultivos celulares.....	108
Marcación de células con colorantes vitales.....	109
Ensayos celulares	109
Cuantificación de citoquinas por ELISA	112
Inmunofluorescencia sobre cortes de bazo	113
Ensayos de biología molecular	113
Análisis estadísticos.....	114
BIBLIOGRAFÍA.....	117

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

(d)pa	(Días) Post administración
(d)pi	(Días) Post infección
Acm	<u>A</u> nticuerpos <u>m</u> onoclonales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la varianza
AR	Artritis Reumatoidea
BCR	Receptor del linfocito B, del inglés <u>B</u> <u>c</u> ell <u>r</u> eceptor
Bregs	Linfocitos <u>B</u> <u>r</u> egulatorios
CCL	Quimiocina, ligando con dos cisteínas unidas, del inglés <u>C</u> - <u>C</u> <u>m</u> otif <u>l</u> igand
CD	<u>C</u> lúster de <u>d</u> iferenciación
CFSE	Del inglés <u>C</u> arboxyfluorescein <u>S</u> uccinimidyl <u>E</u> ster
CG	<u>C</u> entro <u>g</u> erminal
CMH	<u>C</u> omplejo <u>m</u> ayor de <u>h</u> istocompatibilidad
CPA(s)	<u>C</u> élula(s) <u>p</u> resentadora(s) de <u>a</u> ntígeno(s)
CpG	Citosina trifosfato seguida de guanina trifosfato
CTLA4	Antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos, del inglés <u>c</u> ytotoxic <u>T</u> - <u>l</u> ymphocyte <u>a</u> ntigen <u>4</u>
CXCL	Quimiocina, ligando con dos cisteínas unidas por un aminoácido diferente (X), del inglés <u>C</u> - <u>X</u> - <u>C</u> <u>m</u> otif <u>l</u> igand
DE	Desviación estándar
EAE	<u>E</u> ncefalomielitis <u>a</u> utoinmune <u>e</u> xperimental
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EEC	Célula efectora temprana, del inglés <u>E</u> arly <u>e</u> ffector <u>c</u> ell
ELISA	enzimoinmunoanálisis, del inglés <u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>S</u> orbent <u>A</u> ssay
EOMES	Del inglés <u>E</u> omesodermin
FAS	Receptor de superficie que media la muerte por apoptosis, CD95
FASL	Ligando para el receptor FAS
FcγR	Receptor del fragmento constante de la inmunoglobulina G, del inglés <u>F</u> c <u>g</u> amma(<u>γ</u>) <u>r</u> eceptor
FCγRIII	Receptor del fragmento constante de la inmunoglobulina G3, del inglés <u>F</u> c <u>g</u> amma(<u>γ</u>) <u>r</u> eceptor <u>III</u>
FDA	<u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> dmistration
FDC(s)	Célula(s) dendrítica(s) folicular(es), del inglés <u>f</u> ollicular <u>d</u> endritic <u>c</u> ells

FOXP3	Del inglés <i>forkhead box P3</i>
G-CSF	Factor estimulante de colonia granulocítica, del inglés <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana, del inglés <i>human immunodeficiency virus</i>
IDO	Del inglés, indoleamina <u>d</u> ioxigenasa
IFM	Intensidad de fluorescencia media
IFN	<u>I</u> nter <u>f</u> erón
IgG2a	Inmunoglobulina G2a
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> euquina
KLH	Hemocianina de lapa californiana, del inglés <i>keyhole limpet hemocyanin</i>
KLRG-1	del inglés, killer cell lectin-like receptor G1
KO	Deficiente genéticamente, del inglés <i>knock-out</i>
LAG3	Proteína Gen 3 de la activación linfocitaria, del inglés <i>lymphocyte activation gene-3</i>
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocítica, del inglés <i>lymphocyte choriomeningitis virus</i>
LES	Lupus eritematoso sistémico
LM	<u>L</u> isteria <u>m</u> onocytogenes
LTα2β1	<u>L</u> info <u>t</u> oxina alfa(<u>α</u>)-2 beta(<u>β</u>)-1
MPEC	Célula precursora de memoria, del inglés <i>memory precursor effector cell</i>
MS	Esclerosis múltiple, del inglés <i>multiple sclerosis</i>
MTX	Metotrexato
MyD88	Del inglés <i>myeloid differentiation primary response 88</i>
NK	Células asesinas naturales, del inglés <i>natural killer</i>
PD-1	Proteína Muerte celular programada -1, del inglés <i>programmed cell death 1</i>
RTX	Rituximab
SLEC	Célula efectora de corta vida, del inglés <i>short-lived effector cell</i>
Tbet	Del inglés <i>T-box transcription factor TBX21</i>
Tcm	Linfocito T de memoria central, del inglés <i>T central memory</i>
TCR	Receptor del linfocito T, del inglés <i>T cell receptor</i>
Teff/em	Linfocito T efector o efector de memoria, del inglés <i>T effector/effector memory</i>
Tfh	Linfocitos T foliculares colaboradores, del inglés <i>T follicular helper</i>
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta, del inglés <i>transforming growth factor beta (β)</i>

Th	Linfocitos T colaboradores, del inglés <i>T</i> <u>h</u> elper
TIGIT	Del inglés <i>T</i> cell immunoreceptor with <u>I</u> g and <u>IT</u> IM domains
TLR	Receptor de tipo Toll, del inglés <i>T</i> oll- <u>l</u> ike <u>r</u> eceptor
TMRE	Tetrametilrodamina, del inglés <u>t</u> etramethyl <u>r</u> hodamine
TNF	Factor de necrosis tumoral, del inglés <u>t</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor
Tregs	Linfocitos <u>T</u> <u>r</u> egulatorios
TS	Transialidasa
VSV	Virus de la estomatitis vesicular, del inglés <u>v</u> esicular <u>s</u> tomatitis <u>v</u> irus
αCD20	Anti-CD20

RESUMEN

Los linfocitos B, además de producir anticuerpos, son capaces de presentar antígenos o secretar citoquinas, a través de las cuales pueden regular la respuesta de linfocitos T. El Rituximab® es un anticuerpo anti-CD20 que se utiliza para el tratamiento de diferentes patologías que efectivamente elimina la población de linfocitos B. En un trabajo previo de nuestro laboratorio reportamos la capacidad que tienen los linfocitos B de producir interleuquina (IL) 17A durante la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*, patógeno causal de la enfermedad de Chagas, así como otras citoquinas. La respuesta inmune protectora contra *T. cruzi* depende fuertemente de los linfocitos T CD8+. Para evaluar si los linfocitos B podrían modular la respuesta de linfocitos T CD8+ durante la infección con *T. cruzi* implementamos un modelo de depleción de estas células, mediante una única inyección del anticuerpo monoclonal contra la molécula CD20, 8 días previos a la infección. Pudimos observar a los 20 días post infección (dpi) que los animales depletados presentaban un aumento significativo del parasitismo tisular en diferentes órganos blancos de la infección, en comparación al grupo control infectado. Además, los animales depletados de linfocitos B e infectados presentaron un porcentaje y número significativamente menor de linfocitos T CD8+ totales y específicos contra el antígeno Tskb20, en comparación al grupo control infectado. La respuesta de linfocitos T CD8+ con fenotipo de memoria y efectora se encontraba significativamente disminuida en el grupo de animales carentes de linfocitos B, en comparación con el grupo control, determinado a los 20 dpi. Seguidamente, el estudio de las características fenotípicas y funcionales reflejó que en ausencia de linfocitos B, los linfocitos T CD8+ proliferaban menos, mostraban un perfil compatible con una mayor apoptosis celular y presentaban un aumento de receptores inhibitorios en comparación con el grupo control. Posteriormente, observamos que en ausencia de linfocitos B la funcionalidad de los linfocitos T CD8+ se encontraba disminuida. Los mismos resultados fueron observados cuando la depleción de linfocitos B fue realizada en animales donde la respuesta de linfocitos T CD8+ ya se había desarrollado casi en su totalidad (12 dpi), sugiriendo que los linfocitos B están influenciando la respuesta de los linfocitos T CD8+ a través del sostenimiento de su diferenciación y/o supervivencia. Adicionalmente, encontramos que la frecuencia de células esplénicas productoras de IL-17A estuvo significativamente disminuida en los ratones infectados depletados de linfocitos B. Finalmente, la inyección de IL-17A recombinante rescató la frecuencia, el fenotipo y la función de los linfocitos T CD8+ generadas en la ausencia de linfocitos B. Los resultados indican que la producción de IL-17A por parte de los linfocitos B o por aquellas células productoras de IL-17A que son influenciadas por los linfocitos B, es clave para el mantenimiento y la función de los linfocitos T CD8 + específicos de *T. cruzi*.

Palabras claves: linfocito B, linfocito T CD8+, *Trypanosoma cruzi*, anti-CD20, IL-17A.

SUMMARY

B cells are the only cells able to produce antibodies. These cells also have antibody independent functions, such as antigen presentation and cytokine secretion, thus they can regulate T cell responses. Anti-CD20 therapy such as Rituximab® (RTX), that depletes B cells, is widely used to treat different illnesses. In a previous work, we found that B cells can produce IL-17A during *Trypanosoma cruzi* infection, in addition to many other cytokines. Through anti-CD20 treatment, elimination of B cells capable of producing cytokines is also achieved. Moreover, CD8+ T cells are key factors to control this parasitic infection. So, we hypothesized that B cells can influence CD8+ T cell responses during *T. cruzi* infection. To test this hypothesis, we injected an anti-CD20 monoclonal antibody, eight days before infection, to deplete B cells. At 20 days post infection (dpi) B cell depleted mice exhibited higher parasitism in the spleen, liver and heart than controls. Further, a significant lower frequency and number of total and parasite specific CD8+T cells in blood, spleen and liver was found in the absence of B cells. Interestingly, B cell depleted mice had lower effector and memory CD8+T cells, than infected controls. Total and *T.cruzi*-specific CD8+T cells from anti-CD20 injected mice had decreased proliferation and a lesser extent of activation but higher levels of apoptosis and expression of inhibitory receptors. Also, CD8+ T cells from B cell depleted mice exhibited a reduced functionality compared with control animals at 20 dpi. In addition, we performed B cell depletion in infected mice at 12 dpi and observed at 20 dpi that they exhibited the same characteristics than those depleted before infection, suggesting that B cells were not influencing CD8+T cell response through antigen presentation but probably sustaining their differentiation or survival. Additionally, we found that IL-17A production by splenic cells of B cell depleted infected mice was strongly reduced. Then, anti-CD20 treated infected mice were injected with recombinant IL-17A. Injection of recombinant IL-17A rescued the frequency, phenotype and function of CD8+ T cells generated in B cell absence. The results indicate that IL-17A production by B cells or other IL-17A producing cells are key for *T. cruzi* specific CD8+T cell maintenance and function.

Keywords: B cell, CD8+ T cell, *Trypanosma cruzi*, anti-CD20, IL-17A.

INTRODUCCIÓN

Linfocitos B

Generalidades de la respuesta de linfocitos B

Los linfocitos B son células del sistema inmune adaptativo capaces de ejercer diferentes funciones, entre las que se destaca la producción de anticuerpos contra distintos agentes patógenos o contra autoantígenos. Su precursor común se encuentra alojado en la médula ósea y el hígado fetal [1, 2]. En dichos órganos estas células transcurren diferentes etapas de desarrollo, adquieren una estructura funcional de inmunoglobulina de superficie llamado receptor del linfocito B (BCR del inglés *b cell receptor*) y a partir de ello se los denominan linfocitos B inmaduros. Luego, emigran de los órganos linfáticos primarios para poblar los diferentes compartimentos donde se alojarán como linfocitos B maduros [3]. Existen dos grandes subtipos de linfocitos B maduros: los linfocitos B-1 y B-2. Estos se distribuyen en el organismo y se diferencian en base a las características fenotípicas por la expresión de diferentes moléculas de superficie, la localización anatómica donde se encuentran y el tipo de respuesta generada luego de su estimulación [4].

Los linfocitos B-1 se originan al comienzo del desarrollo en los órganos embrionarios y su principal función es la de producir los denominados anticuerpos naturales, en ausencia de estímulos provenientes de patógenos o de inmunizaciones [5, 6]. Su ubicación en el ratón se limita principalmente a la cavidad peritoneal y pleural [7]. Por otra parte, los linfocitos B-2 se subdividen en linfocitos B foliculares (comúnmente llamados linfocitos B convencionales) y de zona marginal. Los linfocitos B foliculares circulan por la sangre y linfa para ubicarse dentro de los folículos (zona de linfocitos B) presentes en los órganos linfáticos secundarios como los ganglios linfáticos, amígdalas, las placas de Peyer y el bazo. En el ratón, los linfocitos B de zona marginal se ubican en el área que rodea a las estructuras de linfocitos B foliculares dentro del bazo. Su íntimo contacto con el seno marginal (sitio por donde circula la sangre) permiten que estas células respondan rápidamente a la presencia de agentes patógenos que causan infecciones sistémicas [8].

Ante el ingreso de un antígeno, los linfocitos B foliculares se activan y diferencian, generando una respuesta inmune conocida como reacción de centro germinal (en adelante CG). Dentro del CG, estas células interactúan con los linfocitos T foliculares, los cuales promueven los eventos de expansión clonal, cambio de isotipo de las regiones constantes e hipermutación somática de las regiones variables de las inmunoglobulinas expresadas por los linfocitos B foliculares, que finalmente son positivamente seleccionados según mayor sea la afinidad de su BCR por el antígeno (proceso denominado como maduración de la afinidad) [3]. Como producto de la reacción de CG, se generan linfocitos B de memoria, plasmoblastos o células plasmáticas las cuales tienen la capacidad de secretar los anticuerpos.

Los linfocitos B se caracterizan por la expresión de diversas moléculas de superficie que los identifican y diferencian de otras poblaciones celulares. Entre ellas, la primera en ser reportada fue la molécula CD (del inglés *cluster of differentiation*) 20, que comprende un canal de calcio asociado a la membrana celular y es un marcador de linfocitos B maduros [9]. Durante todas las etapas de maduración, además de expresar CD20, los linfocitos B expresan la molécula CD19, que tiene como función la amplificación en transducción de señales intracelulares [10] y el antígeno común leucocitario de 220kD, conocido como B220 [11].

Como se mencionó anteriormente, el alcance biológico de los linfocitos B no se limita solamente a la producción de anticuerpos, sino que estas células son capaces de ejercer la presentación de antígenos a los linfocitos T así como de secretar diferentes citoquinas, que son proteínas que disparan señales a diferentes células del sistema inmune, a lo largo de sus diferentes estadios madurativos y de diferenciación (resumido en Figura I1).

Funciones independientes de la producción de anticuerpos: presentación antigénica

El desarrollo de la respuesta inmune adaptativa se encuentra supeditado al reconocimiento inicial de los clones de linfocitos específicos para “el antígeno” en particular. Este proceso ocurre cuando las células presentadoras de antígeno (en adelante CPA) exponen diferentes péptidos antigénicos cargados a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo I y II en su superficie, permitiendo su reconocimiento por parte de los receptores de los linfocitos T (en adelante TCR, del inglés *T cell receptor*) de los linfocitos T CD8+ y CD4+ respectivamente. Debido a que las células dendríticas poseen características distintivas especializadas en el procesamiento y la presentación de los antígenos, se propone a éstas como el modelo de CPA “profesionales” [12]. No obstante, se ha descrito que los linfocitos B poseen la capacidad de presentar antígenos ya que expresan las moléculas del CMH y moléculas coestimuladoras CD80/CD86 y CD40, y tienen la capacidad de secretar citoquinas necesarias para llevar a cabo la completa activación de los linfocitos T CD8+ y CD4+ (revisado por [13] y [14]). En relación a esto, diferentes modelos experimentales de infección, autoinmunidad y rechazo de trasplante han establecido que la presentación antigénica por parte de los linfocitos B aseguran una activación óptima de los linfocitos T [15-19].

A pesar de que la función de los linfocitos B como células presentadoras de antígeno dependa, en la mayoría de los escenarios, de la expresión de un receptor BCR específico para el microorganismo en particular (con el fin de que exista internalización del antígeno para su posterior procesamiento y presentación en el contexto del CMH),

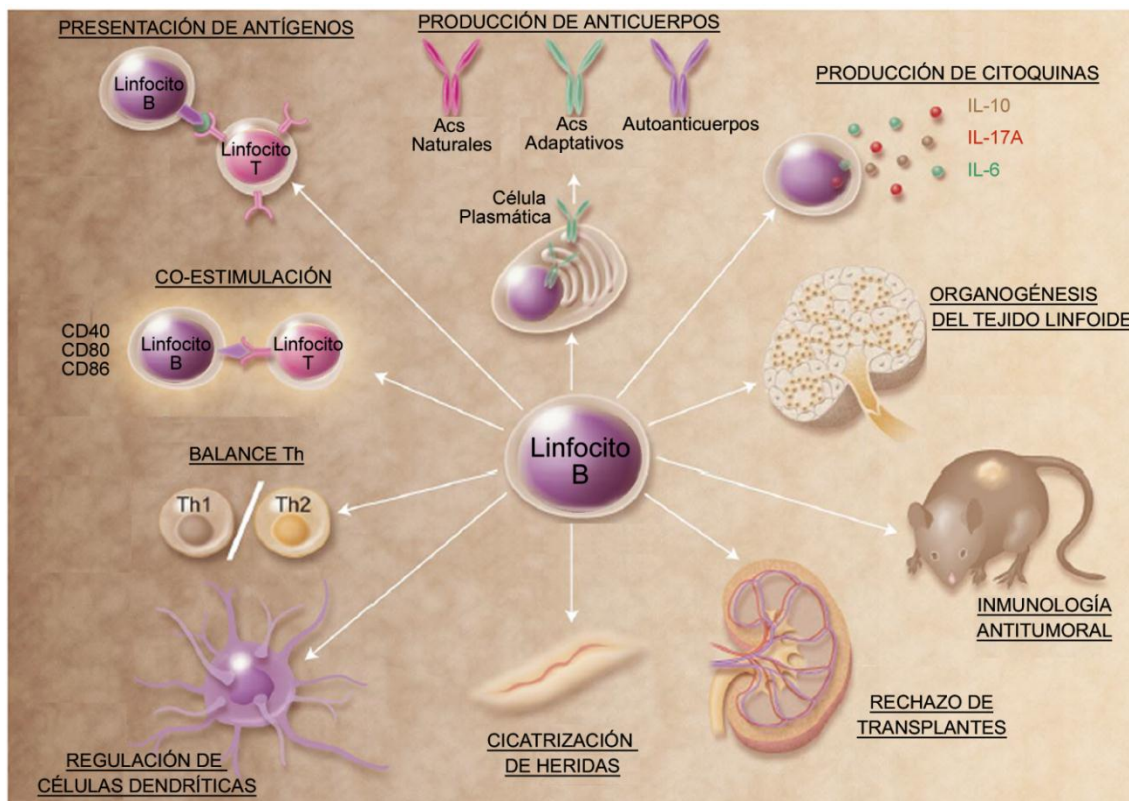


Figura I1: Atributos multifuncionales de los linfocitos B. Los linfocitos B son las únicas células capaces de sintetizar y secretar anticuerpos. Además, los linfocitos B poseen numerosas funciones, independientes de la secreción de anticuerpos, entre ellas colaboran con la homeostasis inmune. Adaptado de [3].

algunos reportes demuestran lo contrario [20, 21]. En tal sentido, se ha reportado que linfocitos B no específicos para la lisozima de huevo de gallina son capaces de adquirir dicha proteína, procesarla y presentarla *in vivo* [21]. Pese a que normalmente se desestima a los linfocitos B como CPA durante el desarrollo de respuestas inmunes primarias (debido a la baja proporción de linfocitos B antígeno específicos al inicio de la respuesta), se ha descrito que estas células pueden actuar presentando antígenos de manera temprana [14]. Esto fue demostrado mediante la utilización de ratones quiméricos en donde los linfocitos B carecían de la molécula del CMH II [22]. En dicho estudio Crawford y colaboradores reportaron que estos ratones quiméricos presentaban una disminuida respuesta de linfocitos T CD4+ al tercer día de ser inmunizados con ovalbúmina [22].

Funciones independientes de la producción de anticuerpos: secreción de factores solubles

A través de la secreción de citoquinas, los linfocitos B participan en diferentes procesos: la ontogénesis y homeostasis de órganos linfáticos secundarios y terciarios;

la generación de respuestas efectoras de linfocitos T CD4+ y la regulación negativa de la respuesta inmune [23].

Los linfocitos B en el desarrollo y reparación tisular

El desarrollo normal de los órganos linfáticos secundarios depende en gran medida de un subtipo de células conocidas como linfocitos inductores de tejidos. No obstante, la presencia de los linfocitos B es crucial para la organización final de las estructuras presentes en dichos órganos, así como para la reparación tisular que se lleva a cabo en estos sitios luego de una respuesta inmunológica. Diferentes reportes han demostrado que la producción de la linfoxina alfa-2 beta-1 (LT α 2 β 1) y el factor de necrosis tumoral (en adelante TNF, del inglés *tumor necrosis factor*) por parte de los linfocitos B es crucial para la formación de las redes de células dendríticas foliculares (en adelante FDC, del inglés *follicular dendritic cells*) esplénicas [24, 25]. De manera análoga, en el contexto de una inmunización con glóbulos rojos de carnero [25, 26], gama globulina de pollo [24] o hemocianina de lapa californiana (en adelante KLH, del inglés *keyhole limpet hemocyanin*) [25], la LT α 2 β 1 y el TNF secretados por los linfocitos B conducen a una correcta estructuración de las FDCs, y por consiguiente, al normal desarrollo del CG y de altos niveles de anticuerpos específicos contra los antígenos utilizados. Adicionalmente, un trabajo publicado por Ngo y colaboradores [27] demostró la importancia que poseen los linfocitos B durante el desarrollo del estroma donde se ubican los linfocitos T esplénicos. En dicho estudio, mediante la generación de un ratón transgénico en donde la expresión de LT α 2 β 1 se reservaba solamente a los linfocitos B, se observó que la cantidad de células estromales de la zona T y consecuentemente la producción de CCL (ligando con dos cisteínas unidas, del inglés *C-C motif ligand*) 21 (quemoquina clave en el reclutamiento de linfocitos T y células dendríticas a la zona T), aumentaban en comparación a un animal deficiente en la linfoxina alfa (LT α ^{-/-}), alcanzando niveles similares a un ratón control. Igualmente, los linfocitos B participan en el desarrollo de la zona marginal esplénica mediante la secreción de la LT α 2 β 1 [25] y de TNF [28]. Otro estudio reveló que los linfocitos B son necesarios para una correcta migración de las células dendríticas y el crecimiento de los nódulos linfáticos secundarios en un animal inmunizado con KLH [29]. Posteriormente, un elegante trabajo publicado por Krumar y colaboradores [30] mostró mediante tomografía de proyección óptica en diferentes nódulos linfáticos, como la LT α 2 β 1 secretada por los linfocitos B era crucial en el incremento del volumen, y en menor medida en el aumento de la red de células endoteliales presentes en dichos órganos cuando los animales se infectaban con el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV de sus siglas en inglés *lymphocyte choriomeningitis virus*).

Además de ejercer funciones relevantes en el desarrollo y la respuesta inmune en los órganos linfáticos secundarios, los linfocitos B desempeñan un rol fundamental

en la formación de tejidos linfoides terciarios [31, 32]. Éstos órganos son estructuras linfoides formadas *de novo* en sitios ectópicos, generalmente como consecuencia de una inflamación crónica [33], aunque a veces pueden aparecer en ausencia de ésta [32].

Los linfocitos B como células moduladoras positivas de la respuesta efectora de linfocitos T

Numerosos estudios han reportado que los linfocitos B son capaces de promover la respuesta de los linfocitos T colaboradores (en adelante Th del inglés *T helper*) tipo Th1, Th2, Tfh (del inglés *T follicular helper*) y Th17, así como también la auto promoción para la producción de anticuerpos mediante un efecto autocrino. En un reporte publicado por Menard y colaboradores se demostró que ratones deficientes en linfocitos B presentaban una respuesta Th1 reducida, en comparación con ratones control, en el contexto de la infección con *Toxoplasma gondii* [34]. Además, la transferencia adoptiva de linfocitos B provenientes de animales infectados con *T. gondii* a ratones deficientes en linfocitos B producía un incremento de la respuesta Th1, denotado por un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ productores de interferón (en adelante IFN) gamma (en adelante IFN γ). En dicho modelo de infección, la transferencia de linfocitos B obtenidos de ratones deficientes en la citoquina TNF o la quemoquina CCL3, aunque no en la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II, no logran ejercer los mismos efectos proinflamatorios sobre la respuesta Th1. De este modo se postula que el TNF y CCL3 serían los mediadores solubles responsables de la capacidad moduladora de estos linfocitos B activados, descartando su participación como CPA [34].

Desde la identificación de la subpoblación de linfocitos B capaz de potenciar las respuestas Th1, denominados Be1 [35], diferentes reportes mostraron como estas células eran capaces de producir IFN γ [16, 36-38]. Barr y colaboradores [16] demostraron que la activación de la molécula adaptadora MyD88 (del inglés *myeloid differentiation primary response 88*), involucrada en la señalización a través de los receptores de tipo Toll (en adelante TLR del inglés *Toll-like receptor*), en los linfocitos B conducía a la producción de IFN γ por parte de estas células durante la infección experimental con *Salmonella enterica* serovar Typhimurinum. Dicha citoquina, producida por los linfocitos B, resulta ser importante para el desarrollo de la respuesta inmune Th1 protectora contra esta infección bacteriana [16]. Posteriormente, se reportó la presencia de una población de linfocitos B productores de IFN γ , cuyo fenotipo se definió como CD11a+Fc γ RIII+, en la infección experimental con *Listeria monocytogenes* (LM), *Escherichia coli* (*E. coli*), el virus de la estomatitis vesicular (VSV por sus siglas en ingles *vesicular stomatitis virus*), o por la administración sistémica de ligandos de TLR [36]. En el modelo de infección con LM, estos linfocitos B eran capaces de producir IFN γ en cantidades comparables a las producidas por las células asesinas

naturales (en adelante NK por sus siglas en inglés *natural killers*), consideradas como la mayor fuente celular productora de IFN γ . Por último, un análisis transcriptómico de los linfocitos B CD11a+Fc γ RIII+ demostró su íntima relación con los linfocitos B foliculares, aunque con algunas diferencias, postulando que estas células productoras de IFN γ tienen su origen en esta población celular [36].

Por otro lado, se ha reportado que los linfocitos B producen interleuquina (en adelante IL) 6 [16, 39-41]. A modo de ejemplo, se demostró que durante los inicios de la infección experimental con el virus de la influenza, animales deficientes (en adelante KO por sus siglas en inglés *knock out*) en IL-6 e IL-21 (en adelante IL-6 KO + IL-21 KO) presentaban una disminución en la respuesta de linfocitos Tfh y linfocitos B de CG comparado con los animales control infectados [42]. Seguidamente, para evaluar el impacto de la IL-6 producida por los linfocitos B en dicho contexto infeccioso, los autores realizaron un experimento *in vitro* donde observaron que el cultivo de linfocitos B obtenidos de animales control, aunque no de animales IL-6 KO, fue capaz de inducir la producción de IL-21 por parte de los linfocitos T CD4+ activados, lo cual es característico de células con perfil Tfh [42]. Asimismo, la transferencia de linfocitos B IL-6 suficientes a los animales IL-6 KO/IL-21 KO infectados rescató parcialmente la respuesta de linfocitos Tfh y B de CG [42].

Por otra parte, Barr y colaboradores reportaron que los linfocitos B de zona marginal son capaces de producir IL-6 durante la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE del inglés *experimental autoimmune encephalomyelitis*), aunque en este contexto su rol es deletéreo, promoviendo la patología [43, 44]. Mediante la generación de ratones quiméricos en donde los linfocitos B eran incapaces de producir IL-6, se encontró que la severidad de la EAE se vio disminuida en comparación con aquellos en donde los linfocitos B eran capaces de secretar dicha citoquina [43]. La protección observada en los animales donde los linfocitos B no producían IL-6 fue mediada por la disminución de la respuesta Th17 [43], la cual cumple un rol clave en la patogénesis de esta enfermedad autoinmune [45].

Además de promover las respuestas Th1 y Th17, los linfocitos B son capaces de promover las respuestas Th2 en la infección con el helminto *Heligmosomoides polygyrus* [46, 47]. Se observó, durante esta infección, que los linfocitos B secretan la LT α 1 β 2 [46]. Esta linfotoxina está encargada de controlar los niveles de CXCL13 [27, 46] y en consecuencia, dirige a las células dendríticas y linfocitos T, que normalmente se encuentran en la zona T, hacia la zona de interacción de los linfocitos T con los linfocitos B, denominada zona T-B [46]. En dicho sitio, los linfocitos T se diferencian hacia un perfil Th2, los cuales poseen un rol importante en la protección contra una reinfección [48, 49]. En tal sentido, la producción de IL-6 por parte de los linfocitos B resulta clave en el desarrollo de la respuesta Th2 efectora y de memoria, así como también en el desarrollo de una respuesta humoral específica contra dicho parásito [47].

Los linfocitos B como células moduladoras negativas en la respuesta efectora de linfocitos T: Linfocitos B regulatorios (Bregs) a través de la producción de citoquinas anti-inflamatorias

Aparte de potenciar las respuestas efectoras de otras poblaciones celulares, se ha descrito que los linfocitos B son capaces de regular respuestas inflamatorias en diferentes escenarios [23, 50]. Estas células no poseen un fenotipo global definido y, a diferencia de la expresión del factor de transcripción FOXP3 en los linfocitos T regulatorios (Treg), no se conoce ningún factor maestro con capacidad de identificar a las poblaciones de linfocitos B con capacidad regulatoria. El primer trabajo en reportar una función regulatoria de los linfocitos B fue realizado en un modelo murino de dermatitis por contacto [51], donde la transferencia adoptiva de células esplénicas totales, aunque no de esplenocitos depletados de linfocitos B, tenía un efecto supresor *in vivo*. Desde entonces, la expansión en el campo de la inmunobiología de los linfocitos B logró evidenciar que la mayoría de los mecanismos inmunosupresores ejercidos por estas células eran mediados por la producción de IL-10 y clasificó a estas células como Bregs (del inglés *B regulatorios*) [52, 53].

Las Bregs se encuentran presentes en numerosos contextos. Mizoguchi y colaboradores reportaron la presencia de linfocitos B CD1d+ productores de IL-10 en ratones KO para la cadena alfa del TCR (TCR α) [54], los cuales desarrollan una enfermedad intestinal crónica de manera espontánea con una incidencia del 60% (revisado por Mizoguchi en [55]). En dicho modelo, la producción de IL-10 secretada por las Bregs reduce la severidad de la enfermedad sin afectar la respuesta patogénica Tfh, interfiriendo en la cascada de señalización de la citoquina proinflamatoria IL-1 y del factor de transcripción STAT-3, que normalmente correlaciona con la severidad de la inflamación intestinal [56]. Se ha visto que estos linfocitos B productores de IL-10 se generan en respuesta a la enfermedad, ya que estas células no se encontraban presentes en animales TCR α KO libres de síntomas [54]. Por otra parte, se ha demostrado que durante las infecciones helmínticas los linfocitos B productores de IL-10 pueden suprimir las respuestas alérgicas [57]. En tal sentido, la transferencia adoptiva de linfocitos B CD1d+ esplénicos provenientes de animales infectados con el parásito *Schistosoma mansoni* tienen la capacidad de suprimir una respuesta alérgica ya establecida, y lo hacen mediante la inducción de células Tregs pulmonares [58].

En relación a las patologías autoinmunes específicas de órganos, se ha descrito que la IL-10 [59] y la IL-35 [60] producida por los linfocitos B juegan un rol fundamental durante el desarrollo [61] y la remisión [41, 60] de la EAE. Se ha propuesto que la secreción de IL-10 por parte de los linfocitos B, en el contexto de dicho desorden autoinmune, comprende un proceso de dos pasos [62]: primero la señalización a través de TLR4 induciría estas células [41, 60] y luego esta señal se amplificaría mediante el estímulo a través del BCR y CD40 [59]. En tal sentido, la

señalización a través del BCR y CD40 en los linfocitos B vírgenes conduce a la producción de IL-35 solamente, mientras que la misma estimulación en los linfocitos B activados conduce a la producción de IL-10 e IL-35. El mecanismo ejercido por estos linfocitos B productores de IL-10 e IL-35 consta de la supresión de la respuesta Th1 y Th17, que normalmente cumplen un rol patogénico durante esta enfermedad autoinmune [59, 60]. Por otra parte, linfocitos Bregs han sido reportados en el modelo murino de autoinmunidad sistémica, el lupus eritematoso sistémico (LES). Scapini y colaboradores reportaron el rol protector que poseen los linfocitos B secretores de IL-10 con fenotipo de células plasmáticas, en un modelo experimental que espontáneamente genera una patología tipo LES, en ausencia de un gen llamado Lyn [63]. Contrariamente, Teichmann y colaboradores publicaron que la presencia de estas células en otro modelo murino con una patología similar (MRL-lpr), no mostraba ninguna función relevante [64]. En tal sentido, la cantidad de linfocitos B productores de IL-10 que se generaban en el modelo de los ratones MRL-lpr era muy baja. De hecho, la transferencia adoptiva de linfocitos B estimulados *in vitro* con un anticuerpo agonista anti-CD40 (que expande una población productora de IL-10) a los animales MRL-lpr, o la administración directa de este anticuerpo a dichos animales, tiene la capacidad de retrasar la progresión de la enfermedad autoinmune [65]. En contraposición a los hallazgos provistos por los modelos murinos, se ha reportado que en los pacientes con LES, los linfocitos B son incapaces de regular la respuesta de linfocitos T productores de citoquinas. En detalle, los linfocitos B CD19+CD24+CD38+ aislados de dichos pacientes, aunque no de los controles sanos, poseen defectos en la producción de IL-10 luego de la estimulación a través del CD40, y consecuentemente no son capaces de inhibir respuestas Th1 [66].

El estudio de las señales capaces de inducir las Bregs sugiere que la activación de diferentes TLRs comprende una etapa determinante. En tal sentido, linfocitos B estimulados *in vitro* con *S. Typhimurium*, o luego de la infección con dicho patógeno, poseen la capacidad de producir IL-10 a través de un mecanismo dependiente de la señalización de TLR2, TLR4 y MYD88 [67]. En este contexto, los linfocitos B productores de IL-10 poseen un fenotipo de células plasmáticas, ya que expresan el marcador clásico CD138, y tienen la capacidad de suprimir la respuesta de neutrófilos, células NK y linfocitos T inflamatorios, que normalmente confieren la protección contra esta infección bacteriana [67]. De manera interesante, se ha reportado que los linfocitos B también producen IL-35 en el mismo contexto infeccioso [60]. Además, ratones deficientes en las dos subunidades que forman la IL-35 como IL-12A KO o EB13 KO adquieren resistencia contra esta infección bacteriana debido a que se potencia la activación de sus macrófagos [60]. Finalmente, se ha demostrado que los linfocitos B productores de IL-10 también se generan en el contexto de la infección con *L. monocytogenes* y poseen un rol deletéreo, ya que su ausencia conlleva a una disminución en la carga bacteriana del bazo, hígado y a una mayor sobrevivencia [68].

En resumen, las numerosas funciones arriba descritas sobre los linfocitos B demuestran su rol activo en diferentes contextos (infecciosos, autoinmunes, etc.). Por consiguiente, la ausencia de estas células, inducida por terapias con fármacos biológicos, pueden repercutir no solamente sobre la respuesta de anticuerpos, sino también en alterar otras poblaciones celulares que dependen de las citoquinas producidas por los linfocitos B o de su capacidad para presentar antígenos.

Terapias con fármacos biológicos inmunomoduladores

Generalidades

En la actualidad, los compuestos biológicos representan más del 30% de los productos farmacológicos licenciados y su campo de aplicación abarca numerosas patologías desde los desórdenes autoinmunes hasta las enfermedades neoplásicas. Dentro de ellos se encuentran los fármacos biológicos inmunomoduladores, que pueden clasificarse en tres grandes categorías según su mecanismo de acción: 1) citoquinas recombinantes humanas, como el factor estimulante de colonia granulocítica (G-CSF del inglés *granulocyte colony-stimulating factor*) y el IFN β , que mimetizan, reemplazan o aumentan los niveles endógenos de aquellas proteínas presentes en el organismo; 2) anticuerpos monoclonales que se unen a un blanco específico desencadenando la eliminación del mismo, como por ejemplo el Rituximab (RTX, anticuerpo monoclonal anti CD20) o el muronomab (anticuerpo monoclonal anti CD3); y 3) biológicos que se unen a su blanco bloqueando su función, como el Etanercept (receptor del TNF) o el Omalizumab (anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente a la IgE) [69].

RTX: Anticuerpo monoclonal anti-CD20

El RTX fue el primer fármaco biológico contra la molécula CD20 en ser aprobado por la FDA en 1997 bajo el nombre de *Rituxan*[®], el cual fue inicialmente utilizado para el tratamiento de linfomas B no Hodgkin, que expresan constitutivamente dicha molécula [70]. Posteriormente, se aprobó su utilización para el tratamiento de pacientes con diferentes patologías autoinmunes inflamatorias como la artritis reumatoidea (AR) y la poliangitis granulomatosa, y en la actualidad existen numerosos reportes que demuestran su potencial en otras enfermedades como el LES y la esclerosis múltiple (MS del inglés *multiple sclerosis*) [71-73]. Su mecanismo de acción se basa en la depleción de los linfocitos B maduros y depende fuertemente de

la expresión de los receptores de la cadena constante de la inmunoglobulina G (FcγR) por parte de las células encargadas de eliminar a los linfocitos B [74]. Adicionalmente, un elegante estudio de microscopía intravital en ratones reflejó que los macrófagos hepáticos, denominados células de Kupffer, son los encargados de arrestar y fagocitar rápidamente a los linfocitos B luego de la inyección con un anticuerpo anti-CD20 [75]. De todos los linfocitos B maduros presentes en los diferentes órganos o en circulación, solo las células plasmáticas de larga vida, generadas a partir de la reacción de CG, no expresan la molécula CD20 y, por lo tanto, son resistentes al tratamiento con RTX [76]. El tratamiento con RTX conduce a la disminución de linfocitos B en los individuos tratados, aunque inesperadamente fue observado que puede depletar a linfocitos T, principalmente CD4+, en pacientes con AR [77]. Con respecto al efecto de anti-CD20 sobre la respuesta de linfocitos T CD8+ en pacientes tratados se dispone de escasa información. No obstante, ha sido reportado que no produce cambios en el porcentaje de linfocitos T CD8+ totales, aunque lleva a una disminución en linfocitos T CD8+CD45RO+ en pacientes con AR, que fue coincidente con una respuesta positiva al tratamiento [78].

Efectos adversos del tratamiento con RTX

A pesar de los resultados benéficos de la terapia con RTX, distintos efectos adversos han sido reportados luego de la utilización de este fármaco [79-83]. Por un lado, se encuentran los efectos adversos propios de la funcionalidad, denominados *on-target*, como las infecciones, malignidades, el síndrome de liberación de citoquinas y la autoinmunidad. Por otro lado, se ubican aquellas reacciones que son propias a la biología inherente del compuesto utilizado, como la generación de anticuerpos contra el fármaco o la hipersensibilidad, y dependen de la inmunogenicidad del mismo [69]. Uno de los defectos *on-target* fue observado en algunos pacientes con MS, quienes inicialmente eran tratados con IFNβ. En dichos pacientes, la adición del tratamiento con RTX gatilló la generación de anticuerpos anti IFNβ, que inicialmente se encontraban ausentes [80]. Se postula que los efectos variables de dicha terapia en pacientes con MS podrían deberse al rol dual que poseen los linfocitos B en la EAE, modelo murino de la MS. Como se mencionó anteriormente, en el contexto de la EAE, los linfocitos B poseen efectos pro-inflamatorios mediante la secreción de IL-6 [43], aunque también se han descrito poblaciones de linfocitos B capaces de suprimir, mediante la producción de IL-10, TGF (factor de crecimiento transformante, del inglés *transforming growth factor*)-β e IL-35, el desarrollo de la neuroinflamación mediada por los linfocitos T CD4+, patogénicos en dicha enfermedad [60, 84].

Por otra parte, se ha reportado que el uso de la terapia con RTX aumenta la posibilidad de infección con el virus de la hepatitis B, citomegalovirus y varicela-zoster,

entre otros [81]. En un estudio de eficacia y seguridad luego del tratamiento con metotrexato (MTX)+RTX o MTX+placebo a pacientes con AR, se observó que el primer grupo desarrollaba mayores niveles de infecciones graves, incluyendo gastroenteritis, pielonefritis, infección por mordedura de gato, influenza, *de novo* hepatitis B y celulitis gangrenosa [82].

En conjunto, estos hallazgos alertan sobre la necesidad de evaluar las causas involucradas en la susceptibilidad a infecciones asociado a la depleción temporal de linfocitos B bajo el tratamiento con RTX. La infección con *Trypanosoma cruzi* afecta la población de linfocitos B a diferentes niveles: induce activación policlonal, respuesta inespecífica de anticuerpos, diferenciación de linfocitos B a plasmoblastos extrafoliculares, respuesta de CG tardía, apoptosis de linfocitos B inmaduros en medula ósea, secreción de IL-17A por parte de los plasmoblastos, etc. [85, 86]. Es por ello que la infección experimental con *T. cruzi* es un excelente modelo para evaluar las consecuencias de la ausencia de linfocitos B sobre otros tipos celulares, particularmente sobre los linfocitos T CD8+ citotóxicos, principales células involucradas en el control de las células infectadas con el parásito.

Enfermedad de Chagas

Generalidades

Alrededor de 110 años atrás, Carlos Chagas publicaba un estudio innovador en la historia de la parasitología, donde describía por primera vez al parásito *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la tripanosomiasis americana, conocida hoy como enfermedad de Chagas [87]. Se considera que esta parasitosis, endémica en 22 países del continente americano, se esparció a través de la especie humana en gran medida en los últimos 200 a 300 años, con el advenimiento de la deforestación progresiva, la crianza del ganado y la apertura de tierras para la construcción de ferrocarriles y carreteras [88]. Se estima que en Argentina hay 1.600.000 personas infectadas (el 4% de la población), 2.300.000 expuestas, y más de 370.000 afectadas por cardiopatías de origen chagásico [89]. Se calcula que al año ocurren cerca de 1.100 nuevos contagios por vía vectorial y 1.500 nacimientos de niños infectados afectados por la transmisión congénita [89]. Estas estadísticas señalan a la Argentina como el país con más infectados en todo Latinoamérica, y a la transmisión congénita como la vía de contagio de mayor relevancia. Adicionalmente, la enfermedad de Chagas ha adquirido una importante relevancia en continentes no endémicos como América del Norte (Estados Unidos y Canadá), la región oeste del Océano Pacífico (particularmente Japón y Australia) y, más recientemente, Europa (principalmente Bélgica, España, Francia, Italia, el Reino Unido de Inglaterra y Suiza, y en menor medida, Alemania,

Austria Croacia, Dinamarca, Holanda, Luxemburgo, Noruega, Portugal y Suecia) [88]. En los mencionados países, el movimiento de personas desde sitios endémicos para la enfermedad lograron que en 2010 existan más de 300.000 personas infectadas con *T. cruzi* en Estados Unidos, más de 5.500 en Canadá, más de 80.000 personas en Europa, más de 3.000 personas en Japón y más de 1.500 personas en Australia [90-92].

Respuesta inmune adaptativa contra T. cruzi

La respuesta inmune adaptativa frente a *T. cruzi* se compone tanto por los linfocitos B así como de linfocitos T CD4+ y CD8+. Inicialmente, luego de la infección con el *T. cruzi* se produce una activación policlonal de linfocitos B. La respuesta de anticuerpos específica para el parásito comienza a establecerse a las 2 semanas post infección, cuando la parasitemia es alta [93]. Es importante señalar que nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en el estudio de la respuesta de los linfocitos B durante esta infección. Así, se ha reportado que durante la infección aguda existe una masiva generación de centros germinales tardía así como también de focos extrafolículos de linfocitos B [93]. En dicho contexto, se han observado plasmoblastos B220+CD138+ en focos extrafolículos [93]. Es relevante mencionar también que la presencia de auto-anticuerpos en la infección ha sido relacionada con patogénesis de la enfermedad [94].

Además del rol protector que ejercen los linfocitos B mediante la producción de anticuerpos, en nuestro grupo de trabajo se reportó que una fracción de linfocitos B con fenotipo de plasmoblastos tienen la capacidad de producir IL-17A durante la infección *in vivo* o cuando son enfrentados *in vitro* con el *T. cruzi* [85]. La IL-17A posee rol inmunomodulatorio, promoviendo la generación de otras citoquinas proinflamatorias y diferentes quemoquinas, las cuales terminan por atraer a los neutrófilos y macrófagos al sitio donde éstas son liberadas [95]. Nuestro grupo ha demostrado que durante la infección experimental con *T. cruzi*, la IL-17 atrae a neutrófilos productores de la citoquina antiinflamatoria IL-10, participando en el control de la inflamación del tejido [96]. El estudio de las señales capaces de conducir a la producción de IL-17A por parte de los linfocitos B mostró que dicho fenómeno depende de la actividad enzimática de la transilidasa (TS) del parásito y de la molécula CD45 presente en la superficie de estas células [85]. El estudio del rol biológico de estos linfocitos B productores de IL-17A, realizado mediante la transferencia de linfocitos B de ratones normales o IL-17A KO a animales deficientes en linfocitos B infectados, reflejó que esta población sería crucial en el control de la replicación parasitaria y la supervivencia del individuo infectado [85]. En consonancia con estos reportes, diferentes estudios han demostrado que durante la infección aguda con *T. cruzi*, la IL-17A posee un rol fundamental en la protección del hospedador [97, 98].

Finalmente se ha descrito que la ausencia congénita de linfocitos B, mediante el estudio en ratones muMT (deficientes en linfocitos B maduros), intensifica el nivel de la infección con *T. cruzi* a expensas de una reducción en los niveles de diferentes citoquinas proinflamatorias producidas durante la etapa aguda y una disminución en la respuesta de los linfocitos T [99]. Por otra parte, estudios de nuestro laboratorio demostraron que los animales muMT infectados poseen niveles de TNF aumentados a expensas de un aumento en la población de linfocitos T CD4+ productores de TNF. Estos linfocitos T CD4+ generados en el contexto de la infección en ratones muMT, que presentaban niveles reducidos de los receptores inhibitorios CTLA-4, PD-1 y LAG3, fueron capaces de condicionar la respuesta de los linfocitos T CD4+ de los animales control [100].

Debido a que *T. cruzi* tiene la capacidad de invadir un amplio rango de subtipos celulares, diferentes de aquellos con origen hematopoyético o con funciones de células presentadoras de antígeno profesionales, la respuesta de linfocitos T es crucial en el control de la infección. Los linfocitos T CD8+ y CD4+ expresan el TCR que se une a los péptidos antigénicos presentados en el contexto del CMH I y II respectivamente. Mientras que los linfocitos T CD8+ se activan y adquieren funciones citotóxicas (descriptas posteriormente en una sección específica dada la importancia de esta población durante el desarrollo de esta tesis), los linfocitos T CD4+ se diferencian en distintas poblaciones Th que regulan la función de los linfocitos B y linfocitos T, así como de células NK, CPA, fagocitos y células no inmunes [101]. Uno sello distintivo durante esta infección es la generación de una fuerte y persistente respuesta Th1, caracterizada por una alta producción de IFN γ y una robusta respuesta de linfocitos T CD8+ específicos contra el parásito (revisado por [102-104]) (Figura I2). De hecho, el grupo de Tarleton y col. han demostrado como la respuesta de linfocitos T CD4+ con fenotipo Th1 son importantes para controlar la infección, mientras que aquellos con fenotipo Th2 contribuyen a la persistencia del parásito y a una mayor severidad de la enfermedad [105]. En consonancia con este resultado se demostró que animales deficientes en la producción de IFN γ o en su receptor (IFN γ ^{-/-} y IFN γ -R^{-/-} respectivamente), muestran mayores niveles de parasitemia y mortalidad en comparación con animales controles infectados [106].

Respuesta de linfocitos T CD8: generalidades y respuesta citotóxica antiparasitaria

Los linfocitos T CD8+, también conocidos como linfocitos T citotóxicos, conforman una herramienta especializada del sistema inmune que tiene la capacidad de erradicar las infecciones intracelulares, controlar infecciones crónicas y erradicar tumores; no obstante estas células también se encuentran asociadas a procesos no deseados como el rechazo de órganos trasplantados y la autoinmunidad entre otros

[107]. La generación de la respuesta inmune adaptativa de los linfocitos T depende de las moléculas del CMH presentes en las CPA, las cuales brindan las señales 1, 2 y 3 promoviendo el desarrollo de estas células. Los patógenos poseen un sinfín de moléculas con potencialidad de unirse a las moléculas del CMH I y II para gatillar la respuesta de linfocitos T. Asimismo, los TCR presentes en los linfocitos T son numerosos y se encuentran clonalmente distribuidos de manera que exista un amplio reconocimiento de los complejos de péptidos unidos al CMH. Sin embargo, a pesar de estos grandes números de posibles combinaciones, la respuesta de los linfocitos T específica para un patógeno se concentra en un pequeño número de epítopes, mecanismo denominado como inmunodominancia [108]. Los mecanismos que subyacen a esta inmunodominancia están explicados por las diferentes estabilidades de los péptidos que se unen al CMH, los distintos niveles y/o las distintas afinidades de los diferentes péptidos presentes en el patógeno y la competición de los linfocitos T por las diferentes CPA (revisado por Tschärke y colaboradores en [109]).

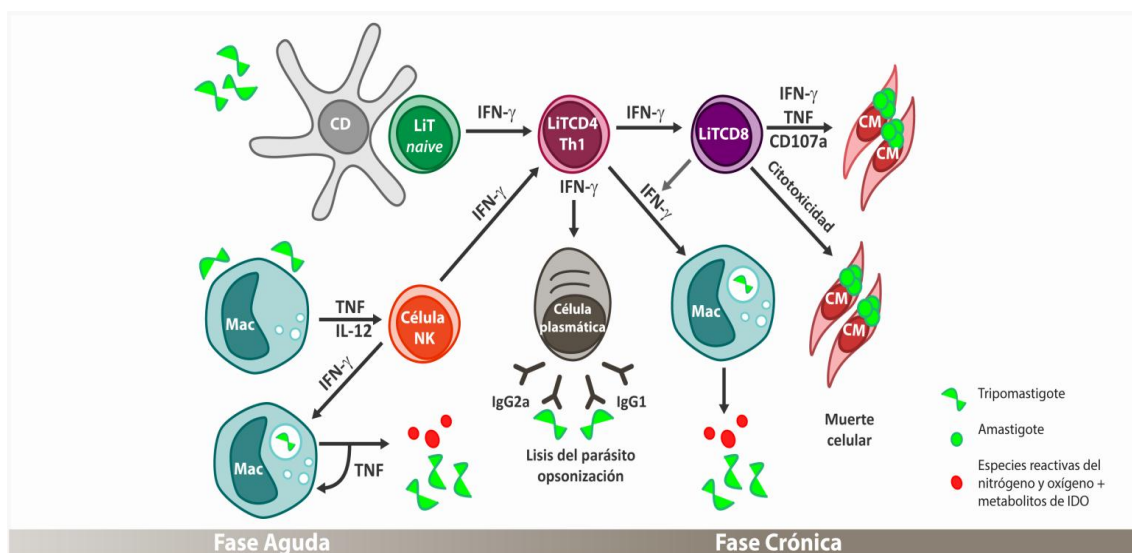


Figura I2: Respuesta inmune frente a *T. cruzi*. Al ingresar al hospedador mamífero, el *T. cruzi* es reconocido por células de la inmunidad innata, entre ellas las células dendríticas (CD) y macrófagos (Mac). Los Mac fagocitan el parásito, se activan y producen grandes cantidades de especies reactivas del nitrógeno y oxígeno así como metabolitos de IDO, capaces de ejercer citotoxicidad directa sobre el protozoo. Además los Mac activados producen IL-12 y TNF que estimulan a las células NK para que liberen IFN- γ , favoreciendo la activación de un mayor número de macrófagos y condicionando la respuesta de linfocitos T. Las CD inician la respuesta inmune adaptativa presentando antígenos a los linfocitos T naíve. En el contexto de grandes cantidades de IL-12 e IFN- γ se desarrolla una potente respuesta Th1 (LiTCD4 Th1) que colabora en la activación de macrófagos y en una respuesta humoral. En esta respuesta predomina la producción de IgG2a e IgG1 específicos que participan en la opsonización y lisis del parásito. Mientras tanto se genera una respuesta citotóxica de linfocitos T CD8+ (LiTCD8) que es crucial para el control del parásito en células musculares (CM), principales blanco de la infección crónica, y tejido en general. Adaptado de [102].

La respuesta de linfocitos T CD8+ durante infecciones virales, modelo clásico de la dinámica de respuesta de linfocitos T, se caracteriza secuencialmente por tres fases: 1) expansión y diferenciación del fenotipo efector, etapa en la que ocurre una fuerte expansión (hasta 10^4 - 10^5 veces) de los clones específicos de linfocitos T y la adquisición de las funciones efectoras; 2) contracción, la cual coincide con el momento de la erradicación del patógeno y constituye el mecanismo mediante el cual el 80-95% de los clones de linfocitos T efectores mueren por apoptosis; y 3) formación de la memoria celular, la cual permanece estable por muchos años de manera independiente de la presencia del antígeno y dependiente de las citoquinas IL-15 e IL-7, las cuales mantienen su sobrevivencia [110] (Figura I3A). Esta población de células de memoria se encuentra posicionada en ventaja numérica y funcional en comparación al pool inicial que le dio origen, lo que le permite desarrollar una dramática expansión clonal y diferenciación a células efectoras secundarias ante un reencuentro con el mismo antígeno [111].

Las señales iniciales que recibe un linfocito T CD8+, que gatillan la expansión clonal y la diferenciación de dichas células, terminan por convertir una célula “desarmada” en una célula polifuncional con capacidad de secretar citoquinas y ejercer citotoxicidad o apoptosis mediada por la vía Fas-FasL (Figura I3B). Mientras que la mayoría de los linfocitos T CD8+ que se desarrollan durante una infección aguda tiene la capacidad de producir IFN γ y TNF, la IL-2 es producida principalmente por las poblaciones que adquieren un fenotipo de células de memoria [112]. Es importante destacar que el estudio de la funcionalidad de estos linfocitos ha demostrado que aquellos con propiedades polifuncionales (es decir, la capacidad de degranular sus vesículas citotóxicas y al mismo tiempo producir diferentes citoquinas efectoras como IFN γ , TNF e IL-2) son más efectivos en controlar un proceso infeccioso [113]. Además, los linfocitos T CD8+ activados aumentan su tamaño y desarrollan un citoesqueleto más sofisticado, el cual es indispensable para secretar sus gránulos citolíticos cargados con perforinas y granzimas hacia el sitio donde hacen sinapsis con la célula infectada [114].

Numerosos reportes han demostrado que durante las infecciones crónicas o el cáncer, los linfocitos T se exponen repetidamente al patógeno y al microambiente inflamatorio que éstos suelen generar, lo que conlleva a un deterioro de su funcionalidad mediante un mecanismo conocido como agotamiento celular (revisado por Wherry y Kurachi en [115]). El rol que cumple la persistencia del antígeno en el desarrollo del agotamiento celular de los linfocitos T ha sido descrito en modelos de infección crónica como el LCMV o HIV-1, en ratones y humanos respectivamente [116-119].

De hecho, los linfocitos T generados en el contexto de la infección crónica con LCMV, son rescatados del proceso de agotamiento celular cuando los animales son tratados tempranamente con Ribavirina para erradicar al patógeno [120]. Por otra

parte, la sostenida expresión de diferentes receptores inhibitorios, los cuales son transientemente expresados en los linfocitos T durante la activación celular, son un sello distintivo del programa de agotamiento celular. Se ha evidenciado que la co-expresión de más de un receptor inhibitorio, como PD1 y LAG3 [119] o PD1 y TIM-3 [121, 122], aumenta el agotamiento de los linfocitos T.

En relación a la infección con *T. cruzi*, se ha descrito que la respuesta de linfocitos T CD8+ es indispensable, posiblemente debido a que el parásito pasa la mayor parte del tiempo dentro de las células, en su estadio de amastigote [123, 124]

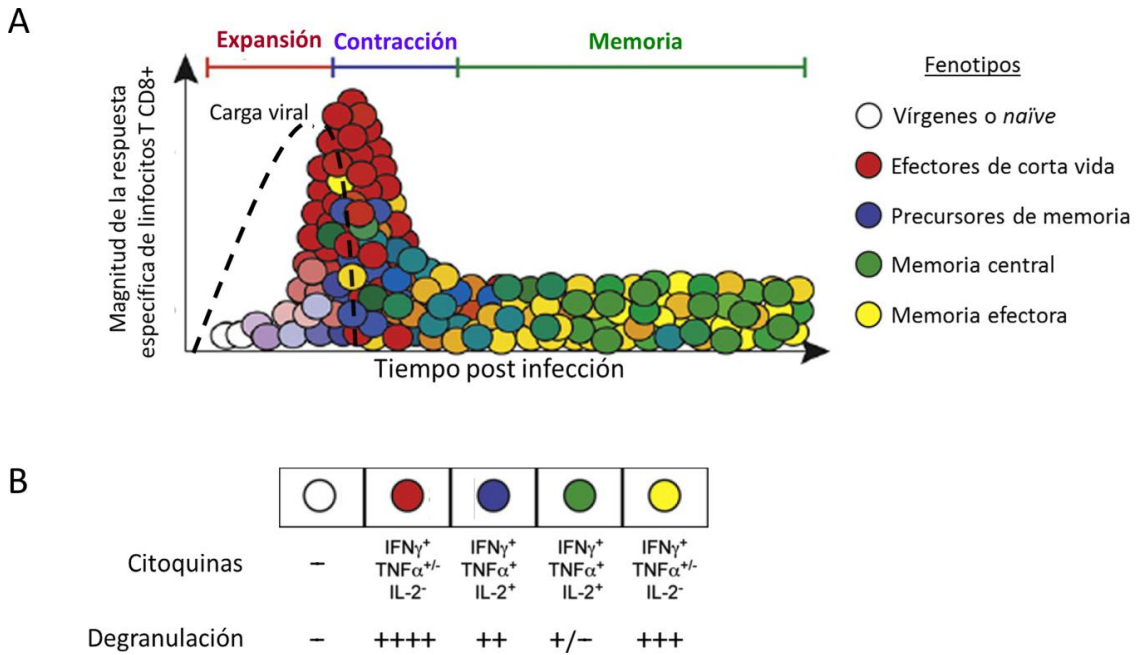


Figura 13: Respuesta antiviral de linfocitos T CD8+. A) Desarrollo de subtipos fenotípicos y funcionales de linfocitos T CD8+ durante el transcurso de una infección viral aguda. Establecida la infección, un pequeño número de linfocitos T CD8+ vírgenes, específicos para el virus, se activan, modifican la expresión de sus moléculas de adhesión, receptores de citoquinas y factores de transcripción. Estos linfocitos T CD8+ específicos activados sufren una expansión clonal y la diferenciación a células efectoras totalmente “armadas” (aunque con una vida corta), la cual controla la infección viral. Otros linfocitos T CD8+ con características de células precursoras de memoria se forman. Una vez eliminada la infección viral, la respuesta de linfocitos T CD8+ se contrae y las células de corta vida mueren por apoptosis, mientras que las células precursoras de memoria se mantienen en el tiempo dando lugar a la formación del pool de células de memoria de larga vida. Los círculos rellenos en colores intermedios entre el blanco, rojo, azul, verde y amarillo corresponden a los estadios de células en transición entre un fenotipo y otro. B) Funcionalidad de los linfocitos T CD8+ a lo largo de los diferentes estadios de diferenciación fenotípica. Adaptado de [125]

(Figura 12). Dicho fenómeno fue evidenciado por el aumento de la parasitemia y la disminución en la supervivencia luego de la infección de ratones depletados de linfocitos T CD8+ [126] o de animales deficientes para la β 2-microglobulina, la cual forma parte del CMH I [127].

La biología del parásito ha revelado que pasadas las 12 horas de la invasión de una célula, el *T. cruzi* escapa de la vacuola de entrada para permanecer en el citoplasma en su etapa replicativa de amastigote. Mediante la utilización de un modelo donde el *T. cruzi* era capaz de secretar ovalbúmina se demostró que el parásito libera diferentes proteínas cuando se encuentra en el citoplasma, las cuales se asocian al CMH I y se presentan en la superficie de la célula infectada para su reconocimiento por parte de los linfocitos T CD8+ [128]. En un principio se vio que algunas proteínas selectas de la familia de la TS se encontraba dentro de las moléculas secretadas por los amastigotes, y por lo tanto eran capaces de inducir una respuesta de linfocitos T CD8+ específica [129, 130]. Más tarde, el secuenciamiento completo del ADN parasitario [131] y el análisis proteómico [132] dilucidaron los posibles blancos a partir de los cuales se podría generar la respuesta de linfocitos T CD8+ específica, revelando la robusta respuesta que se genera contra algunos pocos epítopes codificados por múltiples genes de la TS [133]. A pesar de que los diferentes epítopes de la TS no son los únicos blancos contra los que se genera la respuesta de linfocitos T CD8+, se conoce que son los más inmunodominantes, ocupando más de un 30% de la respuesta de linfocitos T CD8+ en ratones infectados [133] y una proporción significativa en la respuesta humana contra el parásito [134].

La inmunodominancia observada en la respuesta de linfocitos T CD8+ hacia algunos epítopes de la TS [133] dificulta el control inmunológico de la infección, dada la enorme cantidad de variantes antigénicas presentes en la familia de genes que codifican a esta proteína [135]. Además, las proteínas de la TS son blancos sub-óptimos debido a que estas pueden ser visibles para los linfocitos T específicos recién a las 24 o 48 horas luego de la infección, mientras que las proteínas del bastón paraflagelar que se asocian al CMH I son detectadas a las 6 horas posteriores de la infección [136]. Finalmente, a pesar de que se postula que el mecanismo de agotamiento celular no ocurre en gran medida en los linfocitos T CD8+ durante la respuesta contra *T. cruzi*, diferentes estudios han demostrado lo contrario [123]. Así, en dos modelos murinos donde se utilizaron grandes dosis de tripomastigotes al momento de infectar, se observó un incremento de la expresión de PD-1 [137] o de PD-1 y LAG-3 [138], los cuales se correlacionaron con una menor funcionalidad de los linfocitos T CD8+, denotando cierto grado de agotamiento celular. Por otra parte, el estudio de la respuesta de linfocitos T en pacientes con Chagas crónico demostró que, a pesar del bajo nivel de carga parasitaria que presentan los mismos, existe un evidente decaimiento en la respuesta efectora [134, 139-141]. Un claro ejemplo es el estudio publicado por Albareda y colaboradores [141], en el cual se reportó que, en los pacientes Chagasicos infectados crónicamente, la polifuncionalidad de los linfocitos T específicos contra *T. cruzi* se encontraba disminuida en comparación con pacientes jóvenes infectados.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Los linfocitos B poseen diferentes funciones, además de su conocida capacidad de producción de anticuerpos. Estas células son capaces de promover, a través de la presentación antigénica o de regular, a través de la producción de citoquinas y la expresión de moléculas inhibitorias, la respuesta de linfocitos T. Por ello, la instauración de una terapia con anticuerpos monoclonales dirigidos a la molécula CD20, que elimina poblaciones de linfocitos B, conlleva al desarrollo de efectos secundarios causados por la desaparición específica de estas células con capacidad moduladora.

La respuesta de linfocitos T CD8+ constituye un arma indispensable en el control de la infección con patógenos intracelulares como *T. cruzi*. Por lo tanto, el estudio de los factores celulares o solubles capaces de influenciar esta respuesta inmune resulta de gran interés. Durante la infección con *T. cruzi* los linfocitos B experimentan diversos cambios en relación a diferenciación, tasa de proliferación o muerte celular y funcionalidad en cuanto a la producción de anticuerpos y de citoquinas, con ciertas particularidades asociadas a la infección, como por ejemplo que los linfocitos B producen IL-17A, respuesta que no ha sido reportada en otras infecciones. Debido a esto, hipotetizamos que la eliminación de los linfocitos B mediante la inyección de un anticuerpo monoclonal impacta sobre componentes de la respuesta inmune, como la respuesta antiparasitaria de linfocitos T CD8+.

Objetivo general

“Estudiar el efecto de la eliminación de la población de linfocitos B sobre componentes del sistema inmune, específicamente sobre la respuesta de linfocitos T CD8+”

Para desarrollar este objetivo utilizaremos el modelo de la infección experimental con *T. cruzi*, ya que la respuesta de los linfocitos B durante la misma ha sido profundamente caracterizada.

Objetivos específicos

1. Implementar un modelo de depleción de linfocitos B a través de la inyección del anticuerpo monoclonal contra la molécula CD20 en combinación con la infección experimental con *T. cruzi*.
2. Evaluar el impacto de la depleción de los linfocitos B sobre el control parasitario y la magnitud, fenotipo y funcionalidad de la respuesta de linfocitos T CD8+ generada.
3. Estudiar el posible mecanismo mediante el cual los linfocitos B afectan a la población celular de linfocitos T CD8+.

RESULTADOS I

Esquema de administración de α CD20 seguida de la infección experimental con *T. cruzi* en animales de experimentación

Con el objetivo de conocer cómo afecta la depleción de linfocitos B a la respuesta de linfocitos T CD8+ en la infección con *T. cruzi*, en el presente trabajo se planteó como primer objetivo específico la implementación de un modelo experimental de depleción de linfocitos B mediante la administración de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la molécula CD20 (α CD20).

La administración de α CD20 produce una depleción de los linfocitos B que se profundiza en los animales infectados con *T. cruzi*

Para llevar a cabo el primer objetivo específico planteado se evaluó la eficacia de la inyección de una dosis de α CD20 en animales sin infectar. Para ello, células del bazo de animales que no recibieron α CD20 (0 días post administración; dpa) o que fueron tratados con este anticuerpo fueron obtenidas a diferentes dpa para evaluar por citometría de flujo la frecuencia y número de linfocitos B. Previamente, las células fueron incubadas con anticuerpos monoclonales (Acm) anti-CD19 y anti-B220 (ambas proteínas presentes en la superficie de los linfocitos B) murinos marcados con diferentes fluorocromos para luego ser analizadas.

En la Figura 1A se muestra, en gráficos de dos parámetros, la frecuencia de linfocitos B220+CD19+ en la población linfoide (determinada en un gráfico de tamaño o FSC vs granularidad o SSC) a diferentes dpa. Adicionalmente, la Figura 1B representa el gráfico del estudio de la cinética a todos los dpa.

Se puede observar una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos B a los 4, 8, 14 y 21 dpa (Figura 1B), evidenciándose una depleción casi total a la semana de la administración de α CD20 (8 dpa) (Figura 1A,B). La disminución en la frecuencia de los linfocitos B fue transitoria, ya que, casi al mes (28 dpa) de la inyección con α CD20, el porcentaje de estas células se incrementó nuevamente, sin mostrar diferencias significativas respecto a los valores de referencia iniciales (0 dpa)(Figura 1A,B).

Considerando los resultados obtenidos, se decidió implementar un esquema de infección con *T. cruzi* en los animales inyectados con α CD20 a los 8 dpa.

Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que existe una expansión en el número absoluto absoluto de linfocitos B esplénicos en los ratones infectados con *T. cruzi* [93]. Por ello, en los animales depletados e infectados, se evaluó el

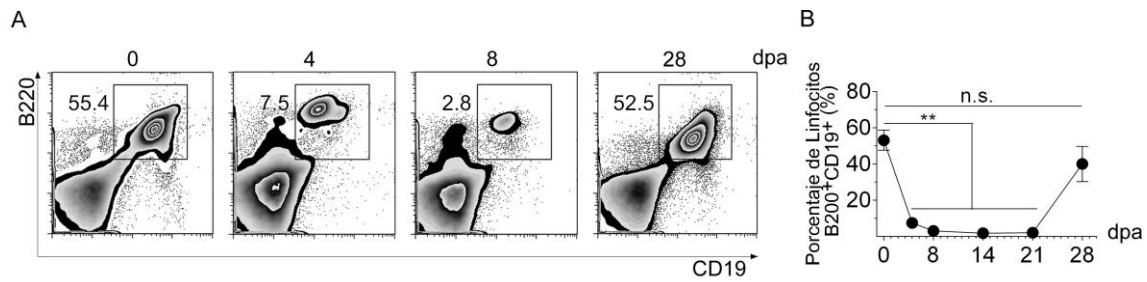


Figura 1: La administración de α CD20 induce, en ratones normales no infectados, una depleción de los linfocitos B220+CD19+ que se restaura con el tiempo. Las células de bazo de ratones controles no inyectados (0 dpa) (n=8) o inyectados con α CD20 y obtenidas a diferentes dpa (4, 8, 14, 21 y 28 dpa) (n=4 para cada dpa) fueron obtenidas e incubadas con Acm anti-CD19 y anti-B220 marcado con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A) Gráficos de dos parámetros representativos de la frecuencia de linfocitos B220+CD19+ en los días 0, 4, 8 y 28 post administración (pa). B) Análisis estadístico del porcentaje de linfocitos B220+CD19+ en bazo a los diferentes dpa. Las significancias de las diferencias de cada dpa fueron estudiadas realizando un análisis estadístico de Anova de una vía seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Dunnett. Las diferencias estadísticamente significativas de los diferentes dpa respecto al grupo control (0 dpa) se indican con ** ($p < 0,01$) (n.s.= no significativo).

porcentaje de los linfocitos B220+CD19+ con el propósito de evidenciar las diferencias presentes en esta población en comparación a ratones infectados que habían sido tratados con un anticuerpo control, inmunoglobulina de ratón de isotipo IgG2a (mismo isotipo que el α CD20 pero que no reconoce ninguna molécula en el sistema experimental), 8 días previos a la infección (grupo control) (esquemático en la Figura 2).

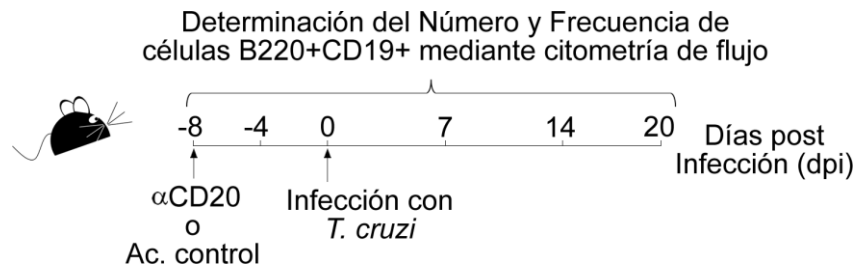


Figura 2: Esquema indicando la secuencia temporal del tratamiento, infección y estudios de citometría de flujo. Los animales fueron inyectados con una sola dosis de anticuerpo anti-CD20 o el anticuerpo control 8 días previos a la infección con *T. cruzi*. Los estudios de citometría de flujo fueron realizados a los días -8, -4, 0, 7, 14 y 20 pi.

En consonancia con los resultados publicados por nuestro grupo de trabajo, en la Figura 3 se puede observar que los linfocitos B esplénicos de los animales del grupo control, presentan una declinación en el porcentaje de los mismos (Figura 3A), aunque no así en número absoluto (Figura 3B) hacia los 20 días post infección (dpi). Contrariamente, los animales depletados de linfocitos B e infectados presentaron en bazo, en comparación con los animales controles infectados, una reducción significativa, prácticamente ausencia, en el porcentaje (Figura 3A) y número (Figura 3B) de linfocitos B220+CD19+ desde el día 0 al 20 post infección (pi) inclusive. De manera

interesante, en el grupo de animales inyectados con α CD20 e infectados, estas células disminuyeron en porcentaje y en número, los cuales se mantuvieron bajos incluso hasta 28 dpa del Acm (último día de análisis).

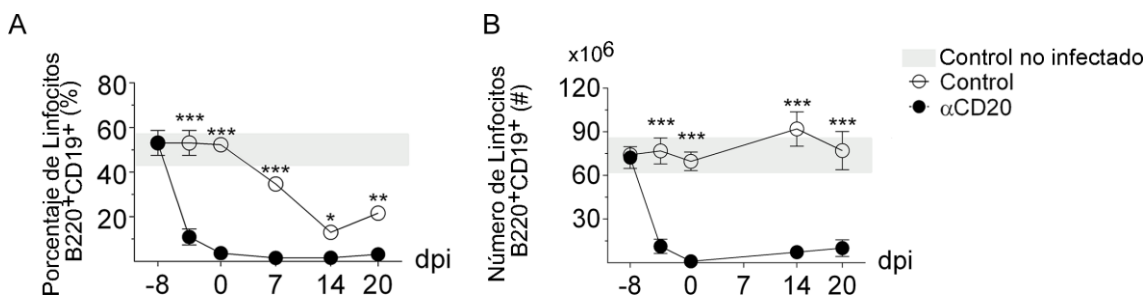


Figura 3: La infección con *T. cruzi* sostiene la depleción de linfocitos B inducida por el α CD20. Las células de bazo de ratones tratados con el anticuerpo control (Control) o con α CD20 e infectados fueron obtenidas a diferentes dpi (-8, -4, 0, 14 y 20 dpi) (n=3 para cada dpi). En simultáneo, células de ratones normales sin tratamiento e infección (n=6) fueron procesadas. Las células obtenidas fueron incubadas con Acm anti-CD19 y anti-B220 marcados con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A) Porcentaje de linfocitos B220+CD19+ en bazo de ratones a diferentes dpi. B) Número de linfocitos B220+CD19+ en bazo, calculado en base al porcentaje obtenido en la Figura 3B. En los gráficos, los círculos vacíos corresponden a los animales infectados tratados con el anticuerpo control y los círculos rellenos corresponden a los animales infectados tratados con α CD20. La barra gris rellena corresponde a los valores obtenidos para el grupo de animales sin tratamiento y sin infección. La significancia de las diferencias de cada dpi entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias estadísticamente significativas entre los animales Control y α CD20 se indican con *, ** y *** (p < 0,05; p < 0,01 y p < 0,001, respectivamente).

Para confirmar los resultados obtenidos en la citometría de flujo, se realizaron cortes histológicos del bazo de los ratones del grupo Control o α CD20 no infectados y en aquellos animales tratados e infectados (obtenidas a los 14 dpi). Las muestras se incubaron con los Acm anti-B220, anti-CD3 (proteína presente en la superficie y marcador de linaje de linfocitos T) y anti-CD8 (proteína presente en la superficie de linfocitos T CD8) murinos marcados con diferentes fluorocromos y posteriormente fueron visualizados en el microscopio de fluorescencia.

El estudio de microscopía de fluorescencia (Figura 4) en el animal tratado con α CD20 sin infectar y a los 14 días de infección reveló que los linfocitos B220 se encontraban notablemente disminuidos, mostrando una ausencia casi total de folículos linfoides B. Por otra parte, no se evidenciaron grandes cambios en la ubicación de los linfocitos T CD3+ y CD8+ (Figura 4).

Adicionalmente, evaluamos el porcentaje de linfocitos B en muestras de sangre e hígado de animales controles o tratados con α CD20 al día 0 y 20 pi. Para ello, las células de ambos tejidos se incubaron con un Acm anti-CD19 y se analizaron por citometría de flujo.

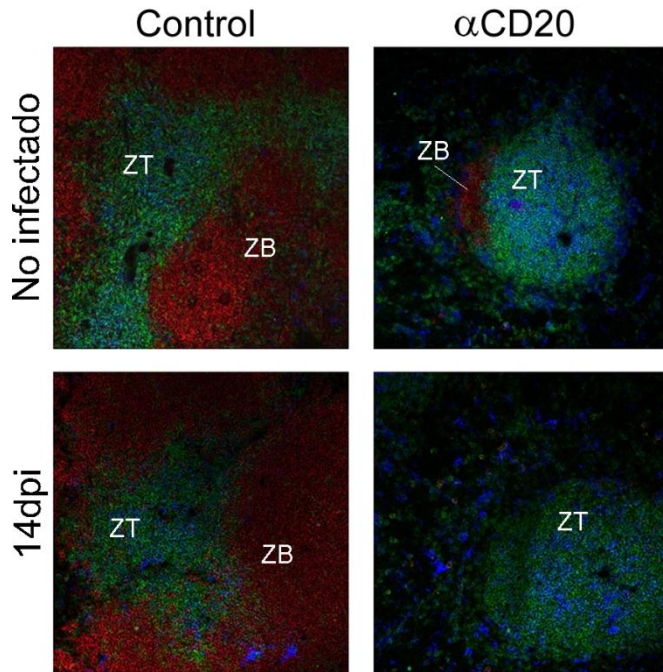


Figura 4: Los linfocitos B220+ están ausentes en el bazo de ratones tratados con α CD20. Imágenes representativas de cortes de bazo de ratones inyectados con α CD20 o con anticuerpo control, no infectados (n=3) e infectados (14 dpi, n=3) que fueron incubados con los Acm anti-B220 marcado con ficoeritrina (PE del inglés *Phycoeritrin*, rojo), anti-CD3 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC del inglés *Fluorescein Isothiocyanate*, verde) y anti-CD8 marcado con aloficocianina (APC del inglés *Allophycocyanin*, azul) y analizados en un microscopio de fluorescencia. ZT= Zona de linfocitos T; ZB= Zona de linfocitos B.

Del análisis de la sangre y el hígado de los grupos de animales estudiados se detectó una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos B en dichos órganos en los ratones tratados con α CD20 en comparación con el grupo control, en ambos dpi (Figura 5A-B).

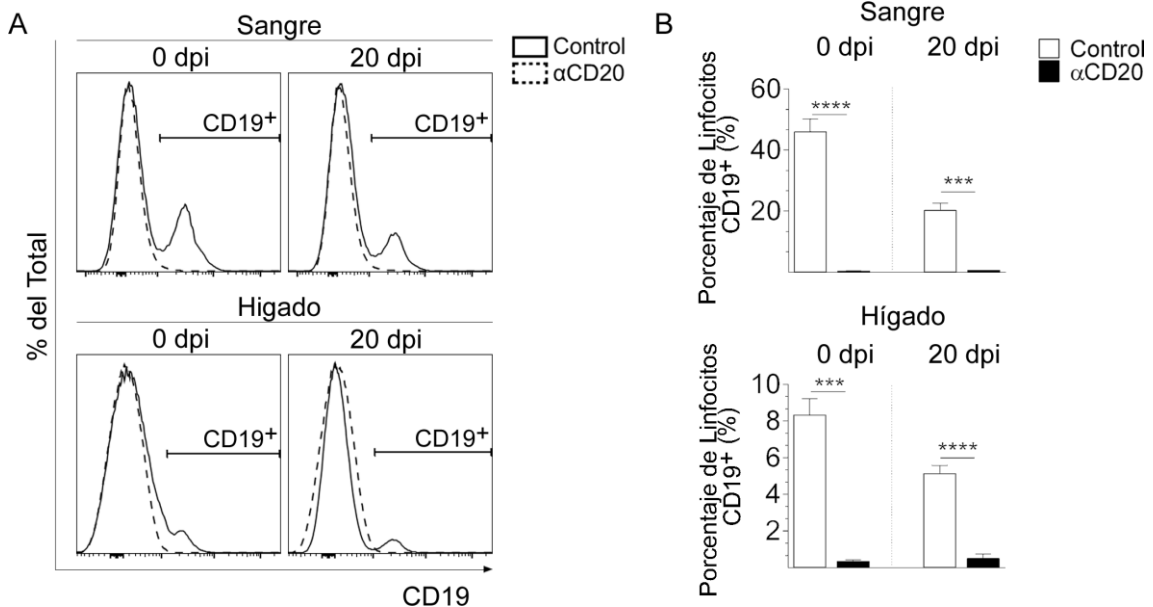


Figura 5: Los linfocitos CD19+ están ausentes en la sangre e hígado de ratones administrados con α CD20. Células totales de sangre e hígado fueron obtenidas de ratones control o depletados (α CD20) sin infección (0dpi) o con 20 días de infección (n=4 para cada grupo del día 0pi y n=6 para cada grupo del día 20pi). Las células fueron incubadas con un Acm anti-CD19 y analizadas por citometría de flujo. A) Histogramas representativos donde se observa la expresión de CD19 en células totales de sangre e

hígado de los grupos anteriormente mencionados. La línea negra continua corresponde a la expresión de CD19 en células del animal control y la línea negra discontinua corresponde a la expresión en células del animal tratado con α CD20. La barra horizontal define la zona de considerada positiva para dicho marcador (CD19+). B) Gráfico de barras mostrando el porcentaje de linfocitos CD19+ a los 0 y 20 dpi. Las barras blancas corresponden a los animales control y las barras negras a los animales tratados con α CD20. La significancia de las diferencias se estudió realizando un análisis estadístico de test-T de muestras no apareadas. Las diferencias estadísticamente significativas entre los animales del grupo control e inyectados con α CD20 en cada órgano y dpi se indican con *** y **** ($p \leq 0,001$ y $p \leq 0,0001$).

CONCLUSIONES I

Observamos que el tratamiento con α CD20 induce una fuerte depleción de los linfocitos B esplénicos a los 8 dpa, que comienza a revertirse 20 días más tarde.

La disminución en la población de linfocitos B que ocurre durante la infección experimental con *T. cruzi* permite mantener una eficiente depleción observada como porcentaje y como número de estas células cuando el ratón fue tratado previamente con α CD20, incluso hasta los 28 dpa.

La disposición general de la zona de linfocitos T esplénica no se ve afectada ante la disminución de la población de linfocitos B.

La depleción de los linfocitos B se observa tanto en un órgano linfático secundario como el bazo así como en órganos no linfáticos como sangre e hígado. Esto nos permite afirmar que el tratamiento con α CD20 conduce a una eliminación sistémica de los linfocitos B del hospedador.

RESULTADOS II

Evaluación del impacto de la ausencia de los linfocitos B en el control de la infección experimental con *T. cruzi*

Habiendo establecido el modelo experimental de depleción de linfocitos B en ratones C57BL/6, el siguiente objetivo de esta tesis doctoral fue evaluar las consecuencias a las que conlleva la depleción de estas células en la respuesta protectora frente a la infección experimental con *T. cruzi*.

En ausencia de los linfocitos B se observó una mayor replicación parasitaria en los tejidos blanco de la infección con *T. cruzi*

Frente a la infección con *T. cruzi* existe una respuesta del sistema inmune innato y adaptativo que es crucial para el control parasitario (revisado por Tarleton en [103]). Por tal motivo, la replicación parasitaria como una medida indirecta de la capacidad del sistema inmune en controlar la infección, fue evaluada. Para ello, muestras de sangre de los animales control e inyectados con α CD20 fueron obtenidas a los días 7, 11, 14, 17 y 20 pi para realizar la cuantificación de los tripomastigotes circulantes (parasitemia). Conjuntamente, muestras de hígado, bazo y corazón de ambos grupos experimentales fueron obtenidas a los 20 dpi para la cuantificación de ADN parasitario (parasitismo tisular).

En la Figura 6A se observa que ambos grupos experimentales presentaron curvas de parasitemia similares. Inicialmente, los parásitos fueron detectados en la primera semana posterior a la infección. Posteriormente, los dos grupos estudiados presentaron un aumento en la parasitemia hasta el día 17 pi (pico de parasitemia). Luego, la parasitemia comenzó a disminuir hacia el día 20 pi, sin presentar diferencias entre los grupos estudiados. Sin embargo, en la cuantificación del parasitismo tisular a los 20 dpi, un aumento significativo ($p \leq 0,001$) del ADN parasitario en el hígado, bazo y corazón, fue observado en los animales depletados de linfocitos B e infectados en comparación con los animales del grupo control (Figura 6B).

La respuesta de linfocitos T CD8+ total y específica para *T. cruzi*, se encontró disminuida en los animales administrados con α CD20

El mayor parasitismo tisular observado en los ratones inyectados con α CD20 sugiere la existencia de una posible desregulación en la respuesta inmune efectora

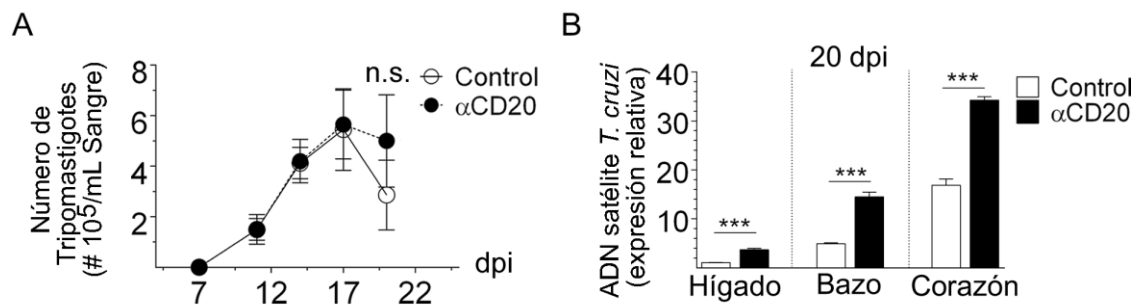


Figura 6: Los ratones inyectados con αCD20 infectados con *T. cruzi* presentaron una mayor carga parasitaria tisular. A) Cinética de parasitemia en el grupo de ratones inyectados con anticuerpo control (círculos blancos) o inyectados con αCD20 (círculos negros) a los 7, 11, 14, 17 y 20 dpi (n=5-6 para cada grupo). B) Carga parasitaria de hígado, bazo y corazón determinadas en el grupo de animales control (barras blancas) o depletados de linfocitos B (barras negras) a los 20 dpi (n=4 para cada grupo). La cuantificación del ADN parasitario fue normalizada a la GAPDH murina, y se asignó el valor de 1 a la expresión relativa de ADN satélite al hígado del animal control infectado. Los valores estadísticos para A) fueron calculados para cada día realizando un ANOVA de dos vías, seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni; y para B) mediante un test-T de dos colas en cada órgano por separado. La diferencias significativas entre los grupos control y αCD20 se indican con *** (p<0,001) (n.s.= no significativo).

encargada de controlar la replicación del parásito. Es por ello que, a continuación, nos enfocamos al estudio de la respuesta de los linfocitos T CD8+, células claves en el control de la replicación intracelular de *T. cruzi*. Para ello, células esplénicas de ratones inyectados con anticuerpo control o administrados con αCD20 fueron obtenidas durante el transcurso de la infección aguda (14, 20 y 34 dpi), para evaluar el porcentaje y número de linfocitos T CD8+ presentes. Animales controles o inyectados con αCD20, no infectados, indicados como día 0 pi, fueron procesados en simultáneo. Seguidamente, las células esplénicas de ambos grupos experimentales fueron incubadas con los Acm anti-CD3 y anti-CD8 murino marcado con diferentes fluorocromos y analizadas en el citómetro de flujo.

El análisis de citometría de flujo reveló un aumento significativo (p<0,05) en el porcentaje de linfocitos T CD8+ en los animales sin infectar tratados con el αCD20 respecto a los controles (Figura 7A y B). Dicho aumento fue relativo, a expensas de la depleción de los linfocitos B esplénicos demostrado anteriormente (Figura 3A). En concordancia con este resultado, no se evidenciaron diferencias numéricas en los linfocitos T CD8+ totales entre los grupos estudiados al día 0 pi (Figura 7C). Mientras que los linfocitos T CD8+ de los animales control presentaron una fase de expansión celular, comprendida entre el día 14 y 20 pi (momento del pico de la respuesta), su equivalente en los animales depletados presentó una respuesta que se asemeja a una contracción celular temprana o a una falta de expansión (Figura 7C). En consecuencia, a los 20 dpi se observó una reducción significativa en el porcentaje (p<0,05, Figura 7B) y número (p<0,01, Figura 7C) de linfocitos T CD8+ en el grupo inyectado con αCD20 en comparación con el grupo control. El grupo control, luego de los 20 dpi, mostró una disminución en el número de linfocitos T CD8+ hacia el último día evaluado (34 dpi), sin

presentar diferencias significativas en los valores finales detectados, en comparación con el grupo depletado (Figura 7B y C).

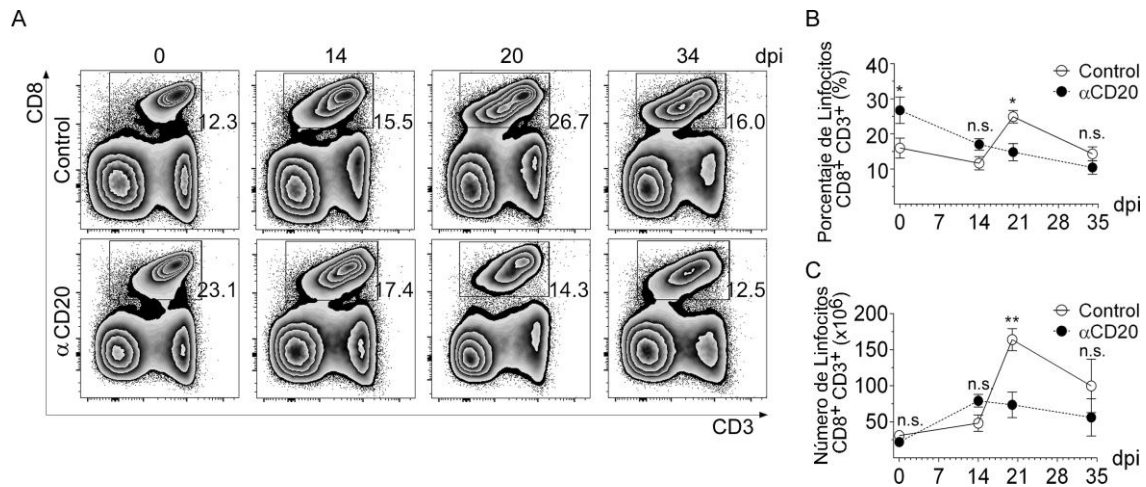


Figura 7: La cinética de expansión de los linfocitos T CD8+ totales se encontró afectada en los ratones inyectados con αCD20 e infectados. Las células de bazo de ratones inyectados con el anticuerpo control (Control) o con αCD20 fueron obtenidas a diferentes dpi (14, 20 y 34 dpi) (n=5-6 por cada grupo para cada dpi). Paralelamente, células de bazo de ambos grupos de animales sin infectar fueron obtenidas (0 dpi). Posteriormente, las células fueron incubadas con los Acm anti-CD3 y anti-CD8 marcado con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A) Gráficos de dos parámetros representativos de la frecuencia de linfocitos CD8+CD3+. B) Representación gráfica de los resultados en A) y su análisis estadístico. C) número de linfocitos CD8+CD3+ esplénicos en los animales control (círculos blancos) o depletados (círculos negros), en los diferentes dpi. La significancia de las diferencias a cada dpi entre los animales Control y αCD20 fue evaluada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con * y ** (p≤0,05 y p≤0,01, respectivamente) (n.s.= no significativo).

Teniendo en cuenta los hallazgos reportados por el grupo del Dr. Tarleton, los cuales muestran que la respuesta de linfocitos T CD8+ contra *T. cruzi* se focaliza hacia una serie de péptidos inmunodominantes codificados por los genes de la familia de la TS [133], y que esta respuesta es importante para el control parasitario [142], nos propusimos caracterizar la respuesta celular específica contra el parásito que se desencadena en ausencia de linfocitos B. Para ello, se eligió evaluar la respuesta contra el antígeno Tskb20, péptido de TS presente en el parásito, que exhibe una alta inmunogenicidad (inmunodominante) en el contexto genético de los ratones utilizados [133]. Para evaluar la frecuencia de linfocitos T CD8+ específicos contra *T. cruzi* se utilizó la herramienta metodológica conocida como tetrámero, que consta de un constructo compuesto por 4 moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (CMH I), del haplotipo H2-Kb, que es expresado por las células de los ratones C57BL6 [143], unidas entre sí covalentemente. Dichas moléculas del CMH I son cargadas con el péptido Tskb20. Finalmente, el complejo de las 4 moléculas de CMH I cargadas se encuentra unido a un fluorocromo, lo que permite su identificación por citometría de flujo. En el caso de que existiesen linfocitos T CD8+ con un receptor del linfocito T específico contra ese antígeno (desde ahora “TCR”, del inglés *T cell*

receptor), existirá un reconocimiento que producirá la unión del tetrámero a los linfocitos T CD8+. Para realizar este estudio, células esplénicas de ratones inyectados con el anticuerpo control o con α CD20 fueron obtenidas en los mismos dpi que evaluamos para la respuesta de linfocitos T CD8+ totales (Figura 7). Las células fueron incubadas con un Acm anti-CD8 y el tetrámero descripto, para su posterior análisis mediante citometría de flujo.

En la figura 8 se puede observar que la respuesta de linfocitos T CD8+ específicos para Tskb20 (de ahora en adelante también denominados “linfocitos T CD8+ específicos”) en los ratones administrados con α CD20, presenta una cinética distinta en comparación con la del grupo control. Inicialmente, ambos grupos experimentales presentaron una expansión clonal de la población de linfocitos T CD8+ específicos, sin presentar diferencias a los 14 dpi (Figura 8A-C). Conforme avanzó la infección, la población estudiada presentó un pico de expansión (20 dpi) y una posterior contracción celular (34 dpi) en el grupo control, mientras que su contraparte en el grupo depletado de linfocitos B, sufrió una contracción temprana (20 dpi). Los animales inyectados con α CD20, en comparación con el grupo control, presentaron una disminución significativa ($p \leq 0,001$) en la frecuencia y número de los linfocitos T CD8+ específicos (Figura 8B y C, respectivamente). Un resultado similar fue observado a los 34 dpi, aunque de manera no significativa. Los resultados obtenidos de la evaluación conjunta de las Figuras 7 y 8 sugieren que los linfocitos B serían una población clave capaz de sostener la respuesta celular CD8+ inducida antes de los 20 dpi. Es por esto que los estudios posteriores del impacto de la depleción de los linfocitos B sobre la respuesta de linfocitos T CD8+, se realizaron al día 20 pi.

Con el objetivo de evaluar si la respuesta de linfocitos T CD8+ específicos se encontraba afectada en un órgano blanco de la infección como es el hígado [144-147], así como a nivel circulatorio (sangre), la presencia de esta población celular fue evaluada en ambos tejidos. Para ello, los leucocitos del hígado y la sangre de animales inyectados con el anticuerpo control o con α CD20, fueron obtenidos en el pico de la respuesta inmune observada en el grupo de animales control (20 dpi). Las células obtenidas fueron incubadas con un Acm anti-CD8 y el tetrámero, para su posterior análisis mediante citometría de flujo.

En la Figura 9A se puede observar que ambos grupos de animales presentaron la población de linfocitos T CD8+ específicos en los órganos estudiados. No obstante, el porcentaje de linfocitos T CD8+ específicos en el hígado y la sangre de los animales depletados de linfocitos B, se vieron significativamente reducidos ($p \leq 0,05$) en comparación con el grupo control (Figura 9B). En conjunto, los resultados obtenidos que muestran una disminución en la población de linfocitos T CD8+ específicos en el bazo (Figura 8) y en el hígado (Figura 9) de los animales sin linfocitos B, podrían

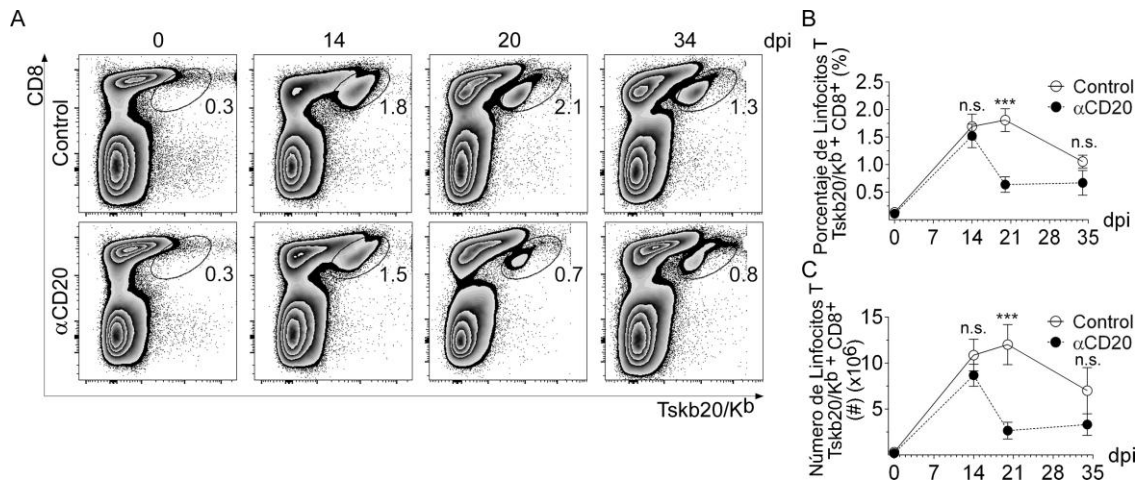


Figura 8: Los ratones depletados de linfocitos B tuvieron una menor frecuencia y número de linfocitos T CD8+ específicos contra *T. cruzi*. Las células de bazo de ratones administrados con el anticuerpo control (Control) o con αCD20 fueron obtenidas a diferentes dpi (14, 20 y 34) (n=5-6 por cada grupo para cada dpi). Día 0 corresponde a ratones tratados con los anticuerpos pero no infectados. Posteriormente, las células fueron incubadas con el Acm anti-CD8 y el tetrámero descrito, marcado con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A) Gráficos de dos parámetros representativos de la frecuencia de linfocitos Tskb20/Kb+CD8+. B) Porcentaje y C) número de linfocitos Tskb20/Kb+CD8+ esplénicos de los animales control (círculos blancos) o depletados de linfocitos B (círculos negros), a los diferentes dpi. La significancia de las diferencias a cada dpi entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con *** (p≤0,001) (n.s.= no significativo).

explicar en parte el aumento de la carga parasitaria observada en dichos animales (Figura 6B).

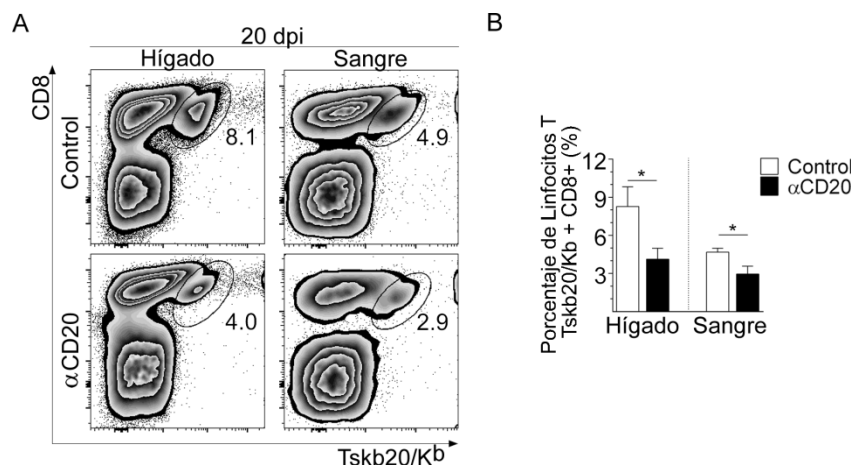


Figura 9: Los linfocitos T CD8+ específicos se encontraron disminuidos en hígado y sangre de los animales carentes de linfocitos B. Las células del hígado y de la sangre de ratones control o depletados fueron obtenidas al día 20 pi (n=5 por cada grupo y órgano). Posteriormente, las

células fueron incubadas con el Acm anti-CD8 y el tetrámero Tskb20 marcado con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A) Gráficos de dos parámetros representativos de la frecuencia de linfocitos Tskb20/Kb+CD8+. B) Porcentaje de linfocitos Tskb20/Kb+CD8+ hepáticos y sanguíneos en animales control (barras blancas) o depletados de linfocitos B (barras negras). La significancia de las diferencias entre los grupos de animales, en cada órgano, fue evaluada realizando un análisis estadístico de test-T de dos colas. Las diferencias significativas se indican con * (p≤0,05).

Seguidamente, nos propusimos estudiar la presencia de linfocitos T CD8+ específicos para el antígeno Tskb18, que corresponde a un epítoto no

inmunodominante de la TS [133]. Para ello incubamos las células esplénicas de los animales controles y tratados con α CD20 sin infectar o en el pico de la respuesta (20 dpi) con el Acm anti-CD8 y un tetrámero cargado con el péptido Tskb18. Las células marcadas fueron evaluadas mediante citometría de flujo.

A diferencia de lo observado con el péptido inmunodominante, los resultados de citometría de flujo no lograron evidenciar la presencia de linfocitos T CD8+ específicos para el péptido Tskb18 en el bazo de los ratones infectados, independientemente del grupo (Figura 10).

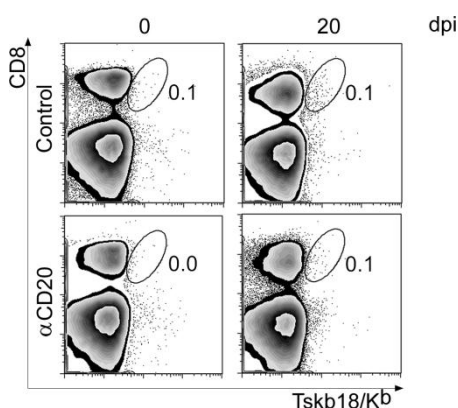


Figura 10: Los animales infectados no presentan linfocitos T CD8+ específicos para Tskb18 en el bazo. Las células de bazo de ratones administrados con el anticuerpo control (Control) o con α CD20 fueron obtenidas al día 0 o 20 pi (n=5 por cada grupo para cada dpi). Posteriormente, las células fueron incubadas con el Acm anti-CD8 y el tetrámero cargado con el péptido Tskb18, marcado con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. Gráfico de dos parámetros representativos de la frecuencia de linfocitos Tskb18/Kb+CD8+.

En ausencia de linfocitos B, la población de linfocitos T CD8+ presenta una disminución en la frecuencia de células efectoras

La presentación de antígenos de *T. cruzi*, por parte de las células presentadoras de antígeno, conduce a una expansión clonal de linfocitos T CD8+ (observada en la Figura 7, 8 y reportes previos [133, 142]), y a una diferenciación hacia un fenotipo de células CD8+ efectoras y de memoria. Así, en función de la etapa de diferenciación en la que se encuentran, los linfocitos T CD8+ se pueden clasificar en: 1) vírgenes o “naïve”, que no contactaron con su antígeno específico y no poseen funciones efectoras, 2) efectoras o citotóxicas, que contactaron con el antígeno y poseen una elevada función efectora, y 3) de memoria, población heterogénea formada por células que contactaron con el antígeno, poseen alta capacidad de auto-renovación y mantienen algunas funciones efectoras [112]. Mediante el estudio de la expresión de las moléculas CD62-L (selectina que participa en la migración de las células a los órganos linfáticos secundarios) y CD44 (glicoproteína de superficie involucrada en procesos de adhesión celular), se pueden distinguir tres fenotipos de linfocitos T CD8+: 1) naïve (CD62-L+CD44-), 2) efectoras y de memoria efectora (CD62-L-CD44+), y 3) de memoria central (CD62-L+CD44+) [148]. Debido a las diferentes características funcionales que presentan las poblaciones mencionadas, el perfil fenotípico de los linfocitos T CD8+ totales y específicos para Tskb20 fue evaluado por citometría de

flujo. Para ello, células esplénicas de los ratones inyectados con el anticuerpo control o con α CD20 fueron obtenidas al día 20 pi. Posteriormente, las células fueron incubadas con el tetrámero y los Acm anti-CD8, Anti-CD62-L y anti-CD44 marcados con diferentes fluorocromos y evaluados por citometría de flujo.

La evaluación de las diferentes poblaciones celulares mostró una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos T CD8+ totales con fenotipo efector/memoria efectora (en adelante llamados “Eff/Em”, del inglés *Effector/ Effector memory*), y un aumento significativo en el porcentaje de células con fenotipo *naïve*, en los animales carentes de linfocitos B, en comparación con el grupo control (Figura 11C). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células con fenotipo de memoria central (Cm del inglés *Central memory*), entre los grupos estudiados (Figura 11C). Se observó que los linfocitos T CD8+ con fenotipo *naïve*, Eff/Em y Cm se encontraron significativamente disminuidos en número en los animales inyectados con α CD20, en comparación con los ratones control (Figura 11D). Es importante señalar que la disminución numérica en las poblaciones *naïve* y Cm es consecuencia de la disminución del número de linfocitos T CD8+ totales a los 20 dpi, como se mostró previamente (Figura 7C).

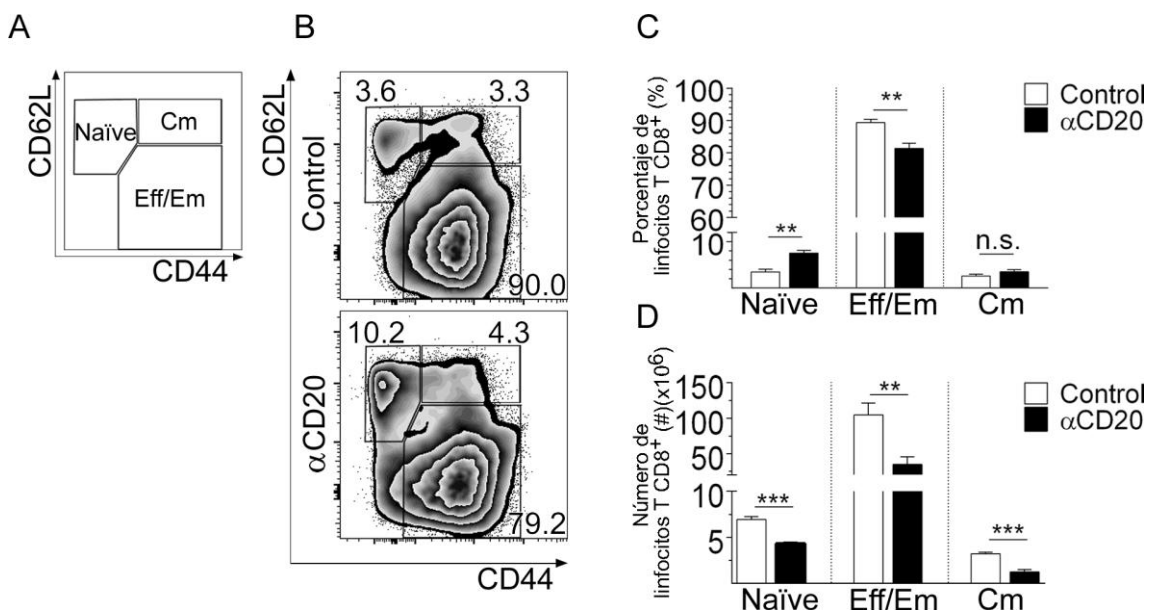


Figura 11: La población de linfocitos T CD8+ con fenotipo Eff/Em y Cm se encontró disminuida en los ratones deficientes en linfocitos B. Las células de bazo de ratones inyectados con el anticuerpo control (Control) o con α CD20 e infectados fueron obtenidas al día 20 pi (n=5-6 por cada grupo). Posteriormente, las células fueron incubadas con el Acm anti-CD8, anti-CD62-L y anti-CD44 marcados con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A) Esquema de la estrategia de regiones utilizadas B) Gráficos de dos parámetros representativos de la frecuencia de los linfocitos T CD8+ totales correspondientes a las poblaciones indicadas en 11A. C) Porcentaje y D) número de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD8+ totales en los animales control (barras blancas) o depletados de linfocitos B (barras negras). La significancia de las diferencias de cada población entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de test-T de dos colas. Las diferencias significativas se indican con ** y *** (p \leq 0,01 y p \leq 0,001 respectivamente) (n.s.= no significativo).

Como era de esperar, al evaluar los estadios de diferenciación en los linfocitos T CD8+ Tskb20+ (células que ya contactaron vía TCR con su antígeno específico), un porcentaje casi indetectable de los mismos presentaron un fenotipo *naïve* en ambos grupos evaluados (Figura 12A y B). Adicionalmente, la población de los linfocitos T CD8+ específicos mostró una pequeña pero significativa reducción en el porcentaje de células con fenotipo Eff/Em en los ratones carentes de linfocitos B, en comparación con los animales control (Figura 12B). Dicha disminución fue mayor cuando los datos se expresaron como número de linfocitos T CD8+ específicos con el fenotipo mencionado (Figura 12C). Finalmente, la frecuencia y número de linfocitos T CD8+ específicos con fenotipo de Cm fue similar entre ambos grupos experimentales analizados al día 20 pi (Figura 12A-C).

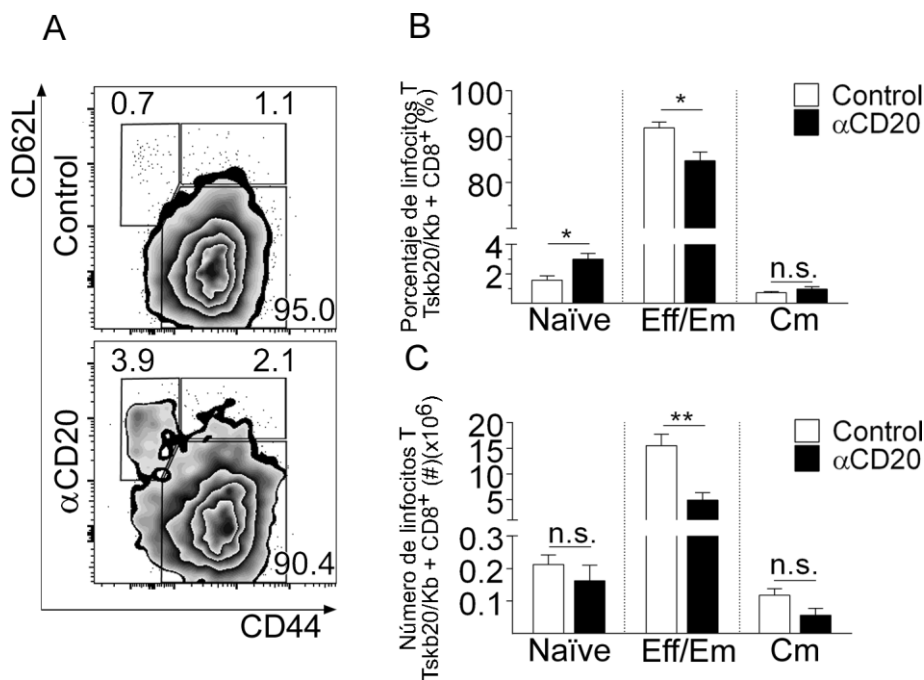


Figura 12: La población de linfocitos T CD8+ específicos con fenotipo Eff/Em se encontró disminuida en los ratones deficientes en linfocitos B. Las células de bazo de ratones inyectados con el anticuerpo control (Control) o con αCD20 e infectados fueron obtenidas al día 20 pi (n=5-6 por cada grupo). Posteriormente, las células fueron incubadas con el tetrámero y los Acm anti-CD8, anti-CD62-L y anti-CD44 marcados con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A) Gráficos de dos parámetros representativos de la frecuencia de los linfocitos T CD8+ específicos correspondiente a las poblaciones indicadas en 11A. B) Porcentaje y C) número de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD8+ específicos en los animales control (barras blancas) o depletados de linfocitos B (barras negras). La significancia de las diferencias de cada población entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de test-T de dos colas. Las diferencias significativas se indican con * y ** (p≤0,05 y p≤0,01 respectivamente) (n.s.= no significativo).

Se ha reportado que durante el pico de una respuesta inmune antiviral, una pequeña proporción de los linfocitos T CD8+ expresa el receptor alfa de la citoquina IL-7 ("IL-7Rα", conocido también como CD127). Estas células son capaces de sobrevivir a la fase de contracción de la respuesta de los linfocitos T, formando parte del pool de células de memoria [149, 150]. Así, mediante el estudio conjunto del IL-7Rα y la

molécula KLRG-1 (del inglés *killer cell lectin-like receptor G1*) dentro de los linfocitos T CD8⁺ activados, se pueden subclasificar las diferentes poblaciones efectoras [151, 152]. En base a la expresión de estos dos marcadores se definen 3 poblaciones: 1) células efectoras tempranas o *EEC* (del inglés *Early Effector Cells*) (KLRG-1-IL-7R α -), las cuales se postulan como el primer estadio de diferenciación efectora, 2) células efectoras de corta vida o *SLEC* (del inglés *Short Lived Effector Cells*) (KLRG-1+IL-7R α -) que son células terminalmente diferenciadas con alta capacidad de ejercer citotoxicidad y producir citoquinas y 3) células efectoras precursoras de memoria o *MPEC* (del inglés *Memory Precursor Effector Cells*) (KLRG-1-IL-7R α +), que sobreviven a la fase de contracción de la respuesta inmune, proliferando de manera homeostática en ausencia del patógeno para diferenciarse a células de memoria. Con el objetivo de identificar qué tipo de población de linfocitos T CD8⁺ se ve afectada en ausencia de linfocitos B, células de bazo de animales inyectados con el anticuerpo control o con α CD20 fueron obtenidas a los 20 dpi. Las células fueron incubadas con el tetrámero y los Acm anti-CD44, anti-CD8, anti-KLRG-1 y anti-IL-7R α murinos marcados con diferentes fluorocromos y se procedió a su análisis por citometría de flujo. Para excluir los linfocitos T *naïve* del análisis, debido a que comparten el fenotipo con las MPEC (KLRG-1- IL-7R α +), se analizó, realizando una selección previa (gate), la población de linfocitos T CD8⁺ totales o específicos que expresaban la molécula CD44, que es indicador de la activación celular, y por lo tanto no está presente en los linfocitos T vírgenes. Dentro de esta población de células CD44+, se evaluó la expresión de KLRG-1 e IL-7R α para definir las diferentes poblaciones anteriormente mencionadas.

Como era de esperar, en el pico de la respuesta inmune (día 20 pi) casi el 100% de los linfocitos T CD8⁺ activados presentaron características fenotípicas correspondientes a las poblaciones de EEC y SLEC (valor obtenido de la sumatoria del porcentaje de EEC y SLEC), en ambos grupos analizados (Figura 13B). En consonancia con los resultados obtenidos en la Figura 11, una disminución significativa en el porcentaje y número de linfocitos T CD8⁺ totales con fenotipo de células SLEC fue observado en los animales carentes de linfocitos B, en comparación con el grupo control (Figura 13C). Al evaluar las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ totales con fenotipo de memoria (MPEC), no se evidenciaron cambios en los porcentajes, aunque si una disminución significativa en el número de estas células en los animales administrados con α CD20 (Figura 13C). Esta disminución sería consecuencia de la disminución de células T CD8⁺ que se muestra en la Figura 7C.

Al analizar el fenotipo de los linfocitos T CD8⁺ específicos pudimos observar una marcada disminución en el porcentaje y número de células con fenotipo de SLEC en los animales carentes de linfocitos B, en comparación con el grupo control (Figura 14A y B). Por otra parte, cuando se analizaron los linfocitos T CD8⁺ específicos con

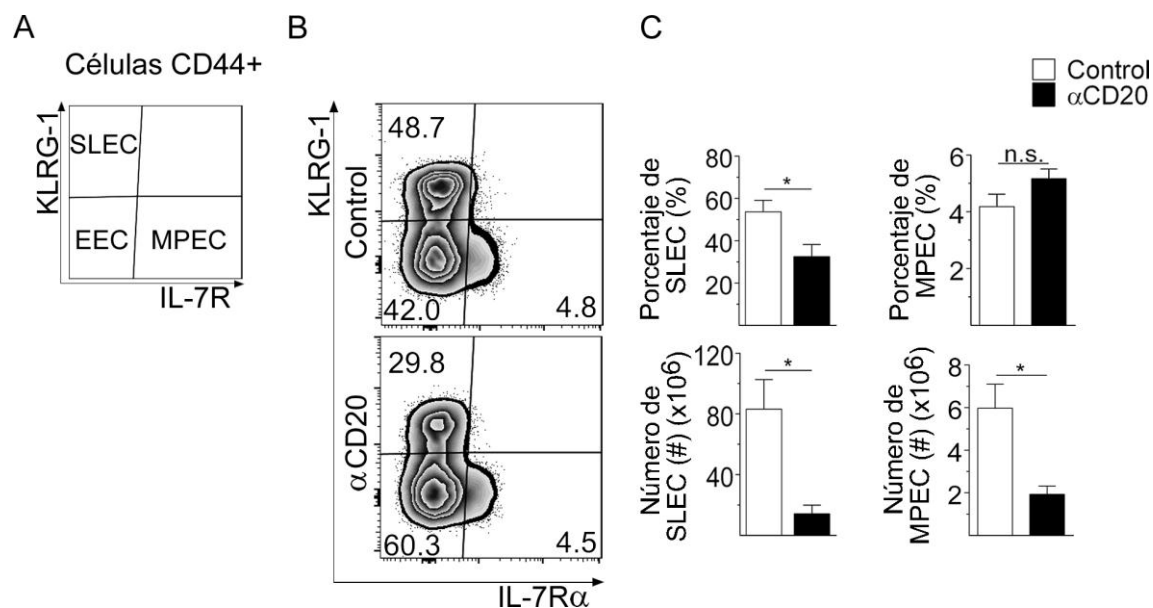


Figura 13: La población de linfocitos T CD8+ con fenotipo de SLEC y MPEC se encontró afectada en ausencia de linfocitos B. Las células de bazo de ratones inyectados con el anticuerpo control (Control) o con α CD20 e infectados fueron obtenidas al día 20 pi (n=5-6 por cada grupo). Los esplenocitos fueron incubados con los Acm anti-CD8, anti-CD44, anti-KLRG-1 y anti-IL-7R α marcados con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A) Esquema las poblaciones que se identifican en base a la expresión de KLRG-1 e IL-7R α . B) Gráficos de dos parámetros representativos de la frecuencia de los linfocitos T CD8+ totales correspondientes a las poblaciones indicadas en 13A. C) Porcentaje y número de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD8+ totales en los animales controles (barras blancas) o depletados de linfocitos B (barras negras). La significancia de las diferencias de cada población entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de test-T de dos colas. Las diferencias significativas se indican con * ($p \leq 0,05$) (n.s.= no significativo).

fenotipo de células MPEC, se observó una disminución significativa en el grupo de animales tratados con α CD20 en comparación al grupo control (Figura 14B). En conjunto, los datos mostrados en las Figuras 11, 12, 13 y 14 demuestran que las poblaciones de linfocitos T CD8+ totales y específicos que se encuentran afectadas en ausencia de linfocitos B, son las células efectoras terminalmente diferenciadas, y la población con fenotipo de memoria.

Los linfocitos T CD8+ de los animales carentes de linfocitos B presentan una menor proliferación y una mayor muerte celular

Con el objetivo de estudiar las posibles causas que originan la disminución de los linfocitos T CD8+ en los animales inyectados con α CD20 (Figura 7 y 8), se evaluó la proliferación celular, determinada a través de la expresión del marcador Ki67, y la muerte celular por apoptosis mediante una medición indirecta de la misma, que es la evaluación del potencial de membrana mitocondrial (determinado por la capacidad de la célula de incluir el colorante TMRE). Para ello, muestras de bazo de animales de ambos grupos experimentales fueron obtenidas a los 20 dpi. Posteriormente se realizó la inmunomarcación de superficie con el tetrámero y el Acm anti-CD8, las células

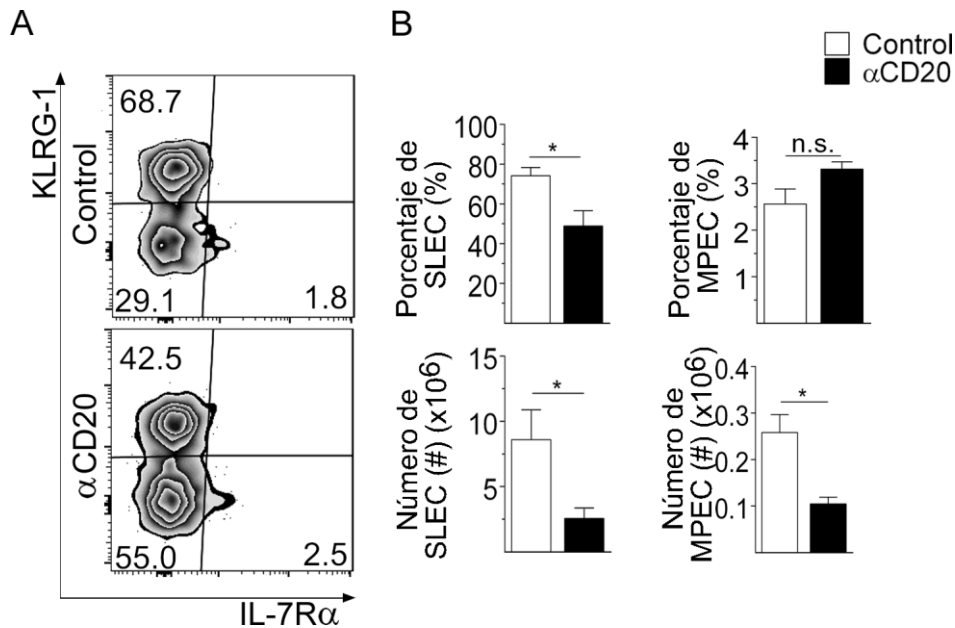


Figura 14: La población de linfocitos T CD8⁺ específicos con fenotipo de SLEC y MPEC se encontró afectada en ausencia de linfocitos B. Las células de bazo de ratones inyectados con el anticuerpo control (Control) o con αCD20 e infectados fueron obtenidas al día 20 pi (n=5-6 por cada grupo). Los esplenocitos fueron incubados con el tetrámero y los Acm anti-CD8, anti-CD44, anti-KLRG-1 y anti-IL-7Rα marcados con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A) Gráficos de dos parámetros representativos de la frecuencia de los linfocitos T CD8⁺ específicos correspondientes a las poblaciones indicadas en 13A. B) Porcentaje y número de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD8⁺ específicos en los animales controles (barras blancas) o depletados de linfocitos B (barras negras). La significancia de las diferencias de cada población entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de test-T de dos colas. Las diferencias significativas se indican con * (p≤0,05) (n.s.= no significativo).

fueron fijadas y permeabilizadas para la incubación con el Acm anti-Ki67 murino o incubadas con el TMRE.

Como se puede observar en la Figura 15, la frecuencia de los linfocitos T CD8⁺ totales y específicos que expresan el marcador de proliferación Ki67, se encuentran significativamente disminuidos, casi en un 50%, en ausencia de linfocitos B en comparación con el grupo control (Figuras 15A y B). Además se puede observar que la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ totales y específicos que incorporaron TMRE en los animales administrados con αCD20 fue significativamente menor que la población de células positivas para TMRE en el grupo control (Figura 15C y D). En conjunto, los hallazgos obtenidos indicarían que en ausencia de linfocitos B los linfocitos T CD8⁺ serían más susceptibles a sufrir apoptosis, presentando una marcada disminución en la tasa de proliferación.

En ausencia de linfocitos B, los linfocitos T CD8⁺ presentaron un menor grado de activación celular y mayores niveles de expresión de receptores inhibitorios

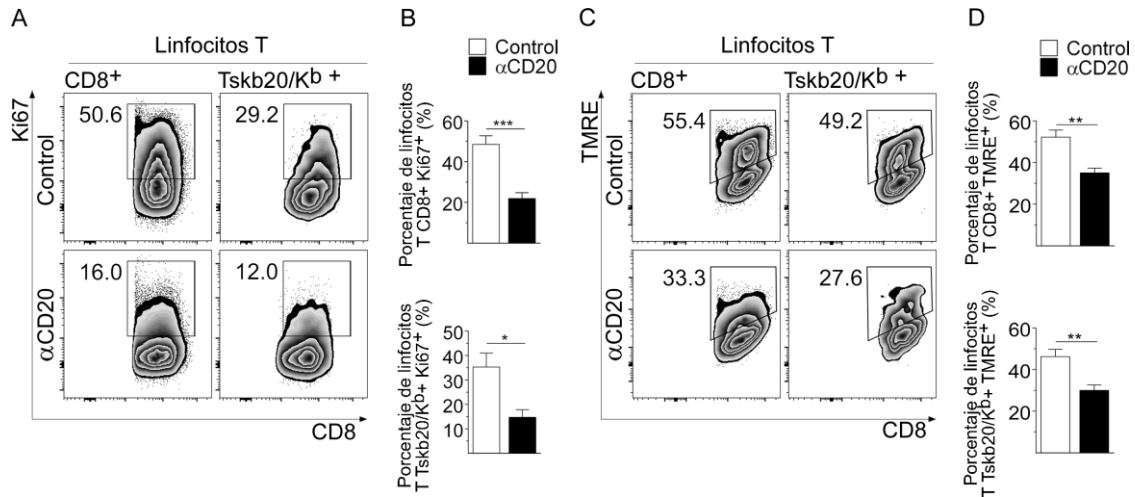


Figura 15: En ausencia de linfocitos B los linfocitos T CD8+ presentan menor capacidad de proliferación y mayor apoptosis. Las células de bazo de ratones inyectados con el anticuerpo control (Control) o con α CD20 e infectados con *T. cruzi* fueron obtenidas al día 20 pi (n=5-6 por cada grupo). Las células fueron incubadas con el tetrámero, anti-CD8, anti-Ki67 o con TMRE. Las células marcadas fueron analizadas por citometría de flujo. Para realizar los análisis se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos T CD8+ o Tskb20+ respectivamente. A,C) Gráficos de dos parámetros donde se definió la región de células Ki67+ A) y TMRE+ C). B,D) Análisis estadístico del porcentaje de las diferentes poblaciones marcadas en A) y C) en los animales control (barras blancas) o depletados de linfocitos B (barras negras). La significancia de las diferencias de cada población entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de test-T de dos colas. Las diferencias significativas se indican con *, ** y *** ($p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente).

La activación de los linfocitos T CD8+ conlleva a una serie de modificaciones en la expresión de diferentes moléculas en la superficie celular. Entre éstas, la regulación negativa de la expresión de CD3 y CD8 se produce como consecuencia de la unión de dichas moléculas al CMH I cargado con el péptido específico o mediante un superantígeno [153]. Por ello, con el objetivo de evaluar el grado de activación celular de los linfocitos T CD8+ totales y específicos, muestras de bazo de los animales control y depletados fueron obtenidas al día 20 pi. Paralelamente, células de ratones no infectados fueron obtenidas como control de la ausencia de la regulación negativa de las moléculas CD3 y CD8. Posteriormente, las células fueron incubadas con los Acm anti-CD3, anti-CD8, y el tetrámero, marcados con diferentes fluorocromos y analizados por citometría de flujo. La expresión de CD3 y CD8, medida como intensidad de fluorescencia media (IFM) para cada fluorocromo es directamente proporcional a la cantidad de dichas moléculas presentes en la superficie celular.

En la figura 16A se puede observar que los histogramas correspondientes a la expresión de CD3 y CD8 en ambos grupos de animales infectados se encuentran en una escala logarítmica significativamente menor que los histogramas correspondientes a células de ratones no infectados (máximo de expresión de CD3 y CD8). Además, el análisis de la expresión de dichas moléculas en los animales infectados, evidenció la existencia de una mayor expresión de CD3 y CD8 en la superficie de los linfocitos T CD8+ totales y específicos en los animales inyectados con α CD20 en comparación al

grupo control (Figura 16A y B). Como era de esperar, a pesar de ser significativas, las diferencias encontradas en los linfocitos T CD8+ específicos fueron de una magnitud menor, debido a que estamos analizando una población activada por el antígeno (Figura 16A y B).

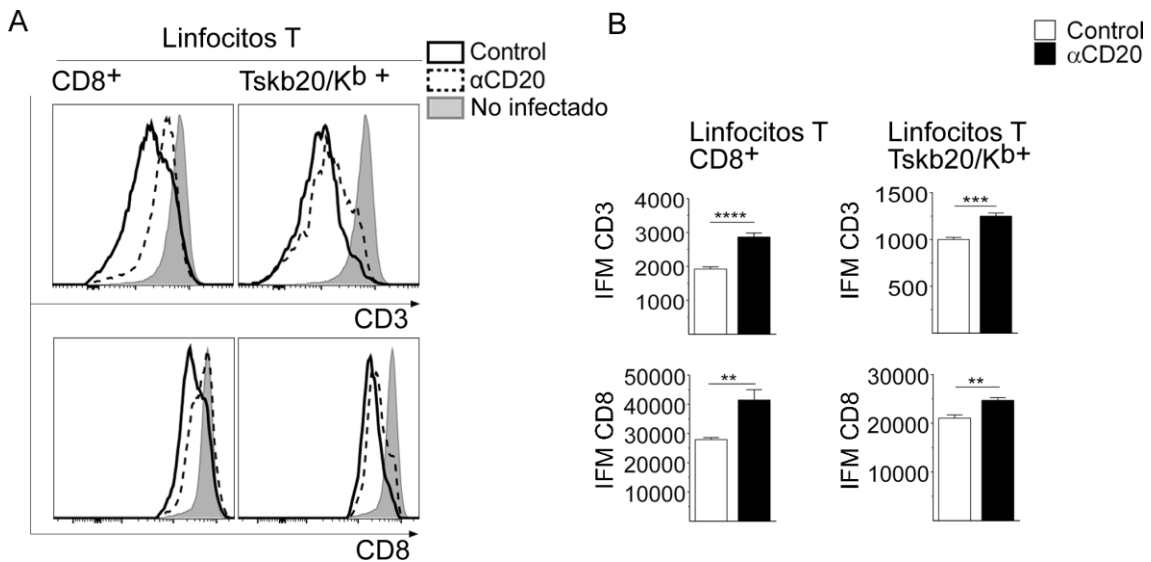


Figura 16: Los linfocitos T CD8+ generados en ausencia de linfocitos B presentan un menor grado de activación celular. Las células de bazo de ratones inyectados con el anticuerpo control (Control) o con α CD20 e infectados, fueron obtenidas al día 20 pi (n=6 por cada grupo). Paralelamente, muestras de bazo de animales sin infectar fueron procesados. Las células esplénicas fueron incubadas con el tetrámero y los Acm anti-CD3 y anti-CD8 murinos marcados con diferentes fluorocromos. Las células marcadas fueron analizadas por citometría de flujo. Para realizar los análisis se seleccionó la población de linfocitos T CD8+ o CD8+Tskb20/Kb+ según cada caso. A) Histogramas representativos de la expresión de CD3 y CD8 en los linfocitos T CD8+ totales o específicos de los grupos control (línea negra continua) y depletados (línea negra discontinua). El histograma relleno en gris corresponde a la expresión en los linfocitos T CD8+ totales del grupo de animales sin infectar. B) Gráficos de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de la expresión de CD3 y CD8 según corresponda donde las barras vacías corresponden a los animales inyectados con el anticuerpo control y las de color negro corresponden a los animales inyectados con α CD20. La significancia de la diferencia de cada población entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de test-T de dos colas. Las diferencias estadísticamente significativas entre los animales Control y α CD20 se indican con **, *** y **** (p<0,01, p<0,001 y p<0,0001 respectivamente).

Por otro lado, la activación de los linfocitos T CD8+ desencadena un incremento en la expresión de la integrina CD11a, que normalmente cumple funciones de adhesión leucocitaria permitiendo las interacciones celulares y la migración a diversos órganos [154]. Por lo tanto, para complementar el análisis anterior obtuvimos las células esplénicas de los animales tratados con el anticuerpo control o con α CD20 al día 20 pi y las incubamos con los Acm anti-CD3, anti-CD8, anti-CD11a y el tetrámero, marcados con diferentes fluorocromos y analizados por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos reflejaron un menor porcentaje de linfocitos T CD8+ totales y específicos que expresaban CD11a en los animales depletados de linfocitos B

en comparación con el grupo control (Figura 17A y B). En conjunto, los hallazgos indican que existe un menor grado de activación en los linfocitos T CD8+ cuando los animales carecen de linfocitos B.

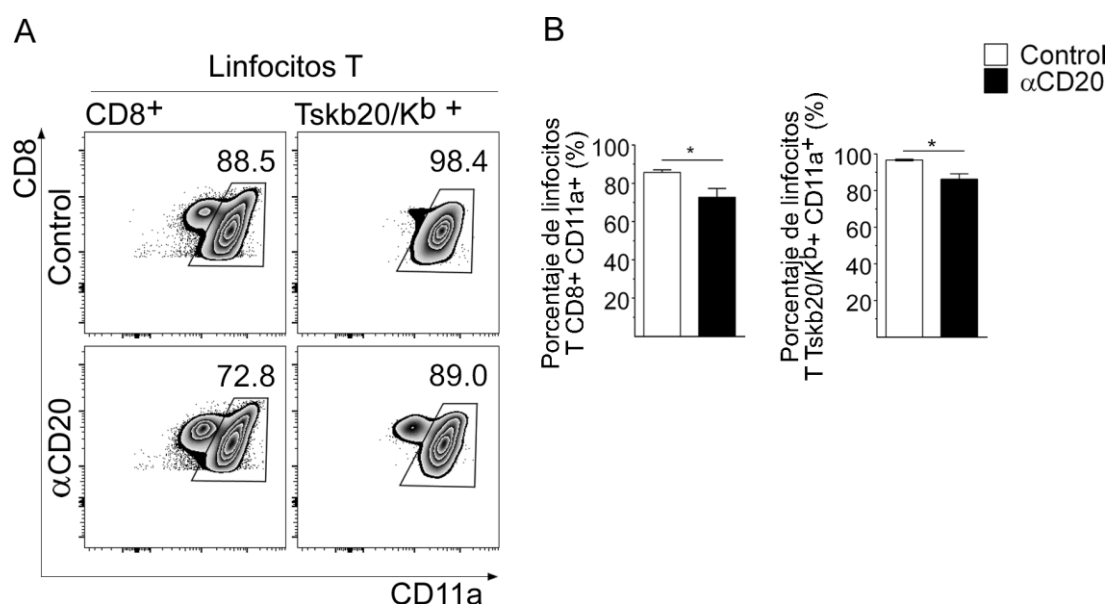


Figura 17: En ausencia de linfocitos B existe una reducción de linfocitos T CD8+ CD11a+. Las células de bazo de ratones inyectados con el anticuerpo control (Control) o con αCD20 e infectados, fueron obtenidas al día 20 pi (n=6 por cada grupo). Las células esplénicas fueron incubadas con el tetrámero y los Acm anti-CD3, anti-CD8 y anti-CD11a murinos marcados con diferentes fluorocromos. Las células marcadas fueron analizadas por citometría de flujo. Para realizar los análisis se seleccionó la población de linfocitos T CD8+ o CD8+Tskb20/Kb+ según cada caso. A) Gráficos de dos parámetros con la región que define las células CD11a+ CD8+ y su porcentaje respectivo. B) Análisis estadístico del porcentaje de la población CD11a+ en los linfocitos T CD8+ totales y específicos. En los gráficos las barras vacías corresponden a los animales inyectados con el anticuerpo control y las de color negro corresponden a los animales inyectados con αCD20. La significancia de la diferencia de cada población entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de test-T de dos colas. Las diferencias estadísticamente significativas entre los animales Control y αCD20 se indican con * (p≤0,05).

Conjuntamente a la expresión de las diferentes moléculas de activación, los linfocitos T pueden expresar una familia de moléculas conocidas como receptores inhibitorios. Como se mencionó en la Introducción, al unirse a sus ligandos, éstos receptores brindan señales negativas que pueden frenar el funcionamiento normal de la célula que lo expresa (revisado por [155]). Por tal motivo, evaluamos la expresión de diferentes receptores inhibitorios en los linfocitos T CD8+ de los grupos experimentales estudiados. Para ello, células esplénicas de ratones control o depletados de linfocitos B, fueron obtenidas al día 20 pi. Paralelamente, muestras de animales sin infectar fueron procesadas. Posteriormente, dichas células fueron incubadas con los Acm anti-CD8, anti-LAG3, anti-TIGIT, anti-PD1 y el tetrámero específico para Tskb20 para luego ser analizadas por citometría de flujo. La cuantificación de los receptores inhibitorios se realizó mediante la determinación de la IFM de cada uno de ellos dentro de la población de linfocitos T CD8+ totales o específicos.

En la Figura 18A se puede apreciar que los linfocitos T CD8+ totales y específicos del grupo tratado con el anticuerpo control, mostraron niveles de expresión de los receptores inhibitorios similares a los de los linfocitos T CD8+ de un animal sin infectar. Sin embargo, los linfocitos T CD8+ totales y específicos en los animales depletados, mostraron un incremento estadísticamente significativo en la expresión de LAG-3 y TIGIT en comparación con el grupo control infectado (Figura 18A y B). Además, la expresión del receptor inhibitorio PD1 se vio débilmente aumentada (en los linfocitos T CD8+ totales) y sin cambios (en los linfocitos T CD8+ específicos) entre ambos grupos estudiados (Figura 18A y B). En resumen, el incremento de LAG-3 y TIGIT en los linfocitos T CD8+ inducidos en ausencia de linfocitos B predispone a esta población celular a ser regulada negativamente, lo cual podría estar asociado a la menor proliferación observada.

En ausencia de linfocitos B se encontró una menor funcionalidad de los linfocitos T CD8+

Para dilucidar si las características fenotípicas distintivas de los linfocitos T CD8+ desarrollados en ausencia de linfocitos B se correlacionaban con alteraciones en la funcionalidad, la capacidad efectora de estas células fue evaluada en los ratones inyectados con α CD20 en comparación con la del grupo control. Para ello, en primer lugar se realizó un ensayo funcionalidad *in vitro*. La función efectora de los linfocitos T CD8+ clásicamente se determinó evaluando la expresión de CD107a (molécula que es expresada en la membrana celular luego del proceso de degranulación), y la producción intracelular de citoquinas en respuesta a distintos estímulos (el antígeno específico y/o mitógenos). Para ello, los esplenocitos de ambos grupos experimentales fueron obtenidos a los 20 dpi. Las células esplénicas fueron cultivadas según las siguientes condiciones: 1) medio de cultivo; 2) estímulo policlonal (PMA/Ionomicina) y 3) estímulo antígeno específico (péptido parasitario Tskb20), durante 5 horas en presencia de monensina y el Acm anti-CD107a. Luego del cultivo, las células fueron incubadas con los Acm anti-CD8, anti-IFN γ y anti-TNF murinos marcados con diferentes fluorocromos para estudiarlas por citometría de flujo. Para analizar la funcionalidad bajo los diferentes estímulos, la estrategia utilizada fue la selección de los linfocitos T CD8+, y dentro de ellas la evaluación individual (Figura 19) o conjunta (Figura 20) de las células productoras de citoquinas y/o de la degranulación.

De los ensayos de estimulación policlonal se puede observar una marcada disminución en la población de linfocitos T CD8+ productores de IFN γ y de TNF, en los animales que carecen de linfocitos B, en comparación al grupo control. En cambio, diferencias en la población de linfocitos T CD8+ que degranularon no fueron encontradas entre ambos grupos experimentales (Figura 19A y B). Cuando se evaluó el

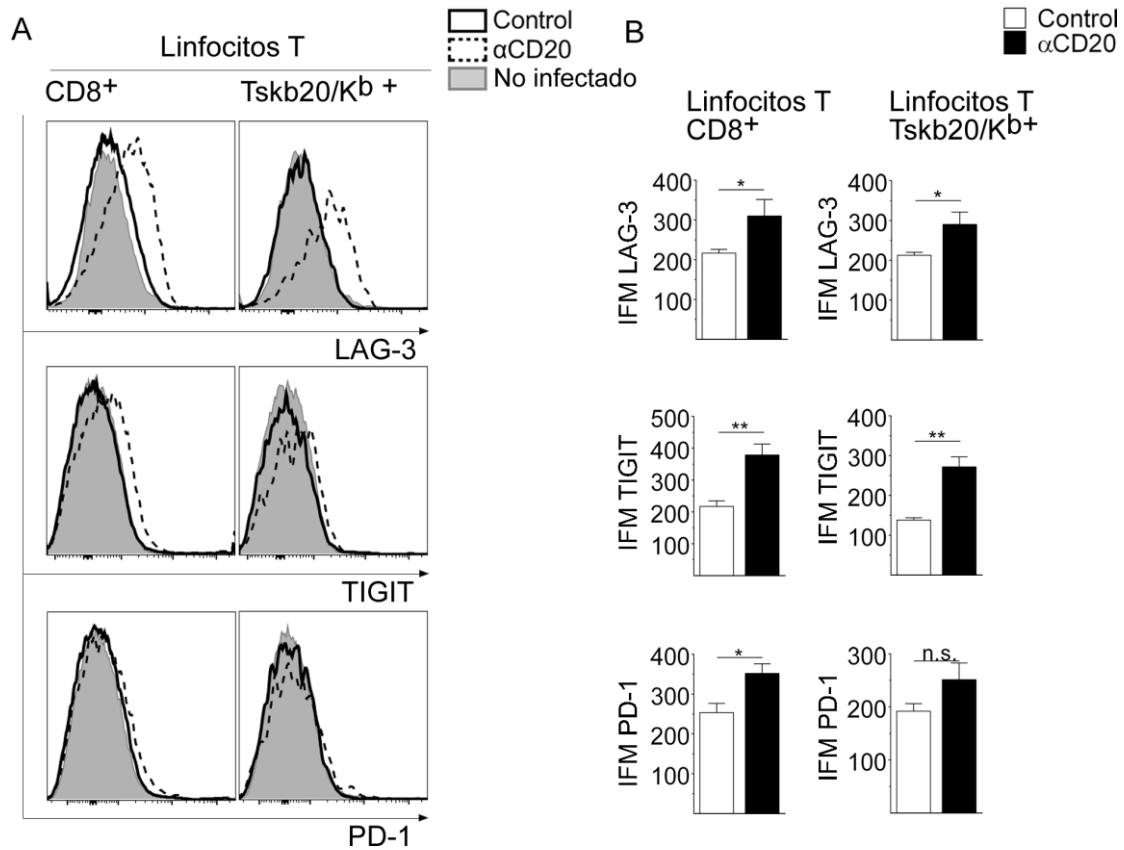


Figura 18: LAG-3 y TIGIT se encontraron incrementados en los linfocitos T CD8+ de los animales inyectados con α CD20. Las células de bazo de ratones inyectados con el anticuerpo control (Control) o con α CD20 e infectados con *T. cruzi* fueron obtenidas al día 20 pi (n=6 por cada grupo). Células de bazo de animales sin infectar fueron procesadas en paralelo. Las células fueron incubadas con el tetrámero y los Acm anti-CD8, anti-LAG3, anti-TIGIT y anti-PD1 murinos marcados con diferentes fluorocromos. Las células fueron analizadas por citometría de flujo. Para el análisis se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos T CD8+ o CD8+Tskb20/Kb+ A) Histogramas representativos de la expresión de LAG3, TIGIT y PD1 en los linfocitos T CD8+ totales o específicos de los animales control (línea negra continua) o depletados (línea negra discontinua). La curva rellena gris corresponde a datos de los linfocitos T CD8+ totales obtenidos de ratones no infectados. B) Análisis estadístico de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de expresión de los marcadores medidos en A) en los animales control (barras blancas) o depletados de linfocitos B (barras negras). La significancia de las diferencias entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de test-T de dos colas. Las diferencias significativas entre los animales Control y α CD20 se indican con * y ** (p<0,05 y p<0,01 respectivamente) (n.s.= no significativo).

porcentaje de linfocitos T CD8+ capaces de producir las citoquinas mencionadas o de degranular bajo las condiciones de estimulación con antígeno específico, se observó una disminución significativa de los tres parámetros evaluados en los animales administrados con α CD20, en comparación al grupo control (Figura 19C y D).

Como se mencionó en la Introducción, la calidad de la respuesta efectora de los linfocitos T CD8+ se encuentra dictada en gran medida por la polifuncionalidad que estas células presentan. Por lo tanto, con el objetivo de profundizar el estudio de la respuesta efectora y, debido a que IFN γ era la principal citoquina expresada por los linfocitos T CD8+ de los animales controles infectados, se analizó el porcentaje de las subpoblaciones polifuncionales dentro de las células que producían esta citoquina en el mismo ensayo de funcionalidad *in vitro*.

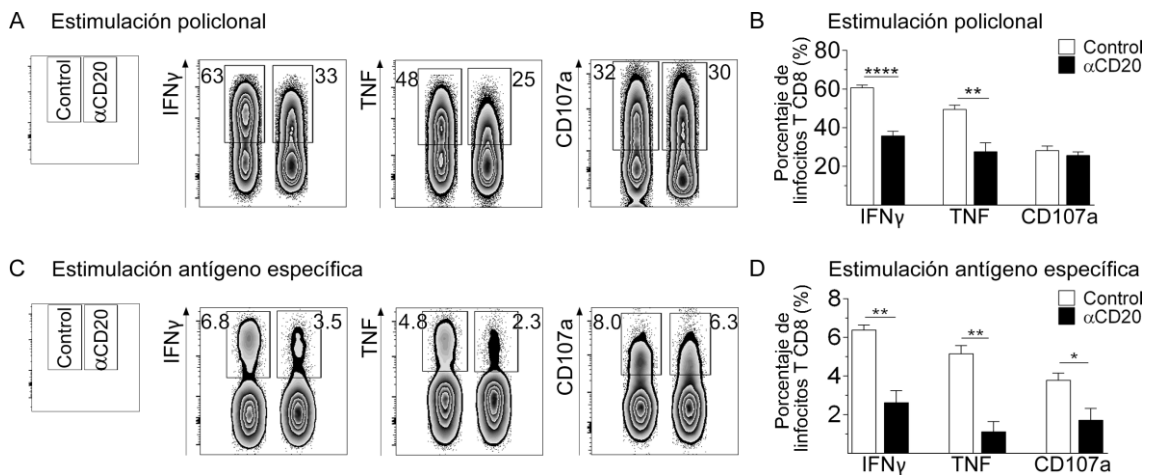
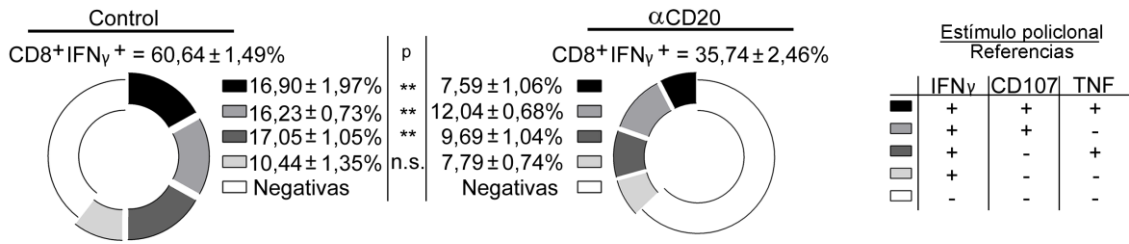


Figura 19: Los linfocitos T CD8⁺ presentaron una disminución en la producción de citoquinas en los animales inyectados con α CD20. Las células de bazo de ratones inyectados con el anticuerpo control (barras blancas) o con α CD20 (barras negras) fueron obtenidas al día 20 pi (n=6 por cada grupo). Dichas células fueron incubadas por 5 horas en presencia de monensina y el Acm anti-CD107a en medio de cultivo (no estimuladas), o con el estímulo (A-B) policlonal o (C-D) péptido de *T. cruzi*. Posteriormente, las células fueron incubadas con los Acm anti-CD8, anti-IFN γ y anti-TNF murinos marcados con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. Para realizar los análisis se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos T CD8⁺. A los valores obtenidos para ambos estímulos, se les descontó el valor correspondiente al cultivo sin estímulo. A,C) Gráficos representativos de la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ productores de IFN γ , TNF o que degranulan (CD107⁺). La región marcada, del grupo control o tratado con α CD20 y el número contiguo corresponden a la población positiva y su porcentaje respectivamente. B,D) Estadística del análisis de A y C respectivamente. La significancia de las diferencias de cada población entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de test-T de dos colas. Las diferencias significativas se indican con *, ** y **** (p \leq 0,05, p \leq 0,01 y p \leq 0,0001 respectivamente).

El estudio de las subpoblaciones efectoras bajo el estímulo policlonal reflejó que el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ con la mayor capacidad funcional (IFN γ +CD107a+TNF+) se encuentra disminuido en un 50% en ausencia de linfocitos B, en comparación a la misma población en los animales control (Figura 20A). Asimismo, ambas poblaciones bifuncionales (IFN γ +CD107a+ e IFN γ +TNF+) se vieron significativamente disminuidas en los linfocitos T CD8⁺ de los animales administrados con α CD20 al compararlas con el grupo control (Figura 20A). Sin embargo, no se observaron diferencias en la población de linfocitos T CD8⁺ monofuncionales (IFN γ +) entre los grupos estudiados (Figura 20A). El análisis de la polifuncionalidad bajo la estimulación específica mostró una significativa disminución en el porcentaje de las células triple positivas en los linfocitos T CD8⁺ de los animales carentes de linfocitos B, en comparación al grupo control (Figura 20B). Una pequeña pero significativa disminución en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ productores de IFN γ y TNF fue observada en ausencia de linfocitos B (Figura 20B). Finalmente, no se observaron diferencias en las poblaciones IFN γ +CD107a+ o simples productoras de IFN γ entre ambos grupos experimentales, bajo la estimulación específica (Figura 20B). En conjunto, estos análisis de funcionalidad *in vitro* advierten la existencia de una

disminución en la capacidad efectora (principalmente por la disminución en la producción de IFN γ) de los linfocitos T CD8+, en ausencia de los linfocitos B.

A Estimulación policlonal



B Estimulación antígeno específica

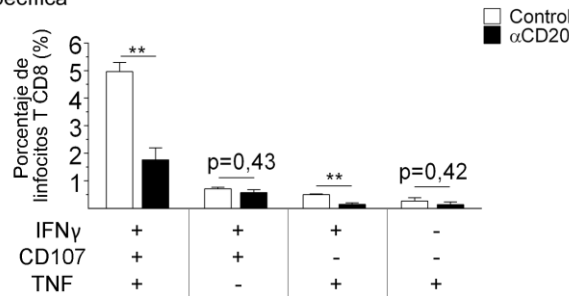


Figura 20: La respuesta citotóxica polifuncional de linfocitos T CD8+ se encontró disminuida en ausencia de linfocitos B. Las células de bazo de ratones inyectados con el anticuerpo control (Control) o con α CD20 fueron obtenidas al día 20 pi (n=6 por cada grupo). Dichas células fueron incubadas por 5 horas en presencia de monensina y el Acm anti-CD107a bajo las condiciones de medio (no estimuladas), o con el estímulo (A) policlonal o (B) específico de *T. cruzi*. Las células fueron incubadas con los Acm anti-CD8, anti-IFN γ y anti-TNF murinos marcados con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. Para realizar los análisis se seleccionó la región de linfocitos T CD8+. A los valores obtenidos para ambos estímulos, se les descontó el valor correspondiente al cultivo sin estímulo. A) Gráfico de torta donde se indica el porcentaje total de células productoras de IFN γ (valor indicado como CD8+IFN γ +, sobre el gráfico) y, dentro de ésta porción, se indican los valores promedio \pm DE de la frecuencia de células IFN γ +CD107a+TNF+, IFN γ +CD107a+, IFN γ +TNF+ o simples productoras de IFN γ , en ambos grupos experimentales. A la derecha se indican los colores asignados para cada una de las subpoblaciones mencionadas. La porción de la torta en blanco corresponde a las células que no producen IFN γ . Los valores indicados de *p* corresponden a la estadística de las diferencias observadas para cada subpoblación entre ambos grupos experimentales. B) Porcentaje de linfocitos T CD8+ positivos para las tres, dos o una de las mediciones realizadas bajo el estímulo específico, según el esquema que se describe debajo del mismo. En el gráfico, las barras blancas corresponden a los animales inyectados con el anticuerpo control y las negras a los animales inyectados con α CD20. La significancia de las diferencias de cada población entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de test-T de dos colas. Las diferencias significativas se indican con ** (*p* \leq 0,01) (n.s.= no significativo).

La adquisición de las funciones efectoras de los linfocitos T CD8+ y el desarrollo de la memoria por parte de estas células dependen en mayor medida de los eventos regulados por la expresión de los factores de transcripción Tbet y EOMES [156]. Adicionalmente, la expresión de Tbet es crucial para la capacidad de producción de IFN γ . Por lo tanto, con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en el ensayo de funcionalidad *in vitro* estudiamos la expresión de estos factores de transcripción en las células de bazo de ambos grupos experimentales obtenidas a los 20 dpi. Paralelamente, células esplénicas de animales sin infectar fueron procesadas. Las

células fueron incubadas con los Acm anti-CD8, anti-Tbet, anti-EOMES y el tetrámero marcados con distintos fluorocromos y analizados por citometría de flujo. El nivel de expresión de los factores de transcripción fue evaluado a través de su IFM dentro de la región de linfocitos T CD8+ totales o específicos.

Como era de esperar en los animales infectados con *T. cruzi* un incremento en la expresión de Tbet (denotado por el corrimiento de la curva hacia valores de intensidad de fluorescencia mayores) en los linfocitos T CD8+ totales y específicos fue observado en comparación con la expresión detectada en los linfocitos T CD8+ provenientes del animal no infectado (Figura 21A). Los linfocitos T CD8+ totales y específicos provenientes del animal inyectado con α CD20, presentaron un leve aumento de Tbet en comparación al grupo no infectado (Figura 21A), y una disminución significativa de la expresión de dicho factor de transcripción en comparación con su contraparte en el grupo control infectado (Figura 21A y B). Estos hallazgos son consistentes con los resultados observados en el ensayo de funcionalidad de la figura 19 y 20. Diferencias en la expresión de EOMES no fueron observadas en ninguna de las poblaciones evaluadas entre los grupos infectados (Figura 21A y B).

Con el objetivo de evaluar la capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8+ realizamos un ensayo de citotoxicidad *in vivo*, donde células esplénicas totales cargadas en su CMH I con diferentes péptidos de *T. cruzi*, fueron transferidas a ambos grupos de animales infectados al día 20 pi. Los péptidos utilizados para cargar a las células esplénicas fueron el Tskb20 (inmunodominante), Tskb18 (péptido no inmunodominante) y Pa8 (péptido relacionado principalmente a otra cepa de *T. cruzi*). De esta manera, los linfocitos T CD8+ específicos para dichos péptidos deberían ser capaces de ejercer citotoxicidad sobre estas células “blanco”. Conjuntamente se transfirieron células sin cargar con ningún péptido, como control de células que no deberían sufrir citotoxicidad.

Previo a la transferencia, las poblaciones de células cargadas y sin cargar, fueron marcadas con los colorantes fluorescentes CFSE (del inglés *Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester*) y el eFluor670 con la finalidad de poder distinguir las en el citómetro posteriormente. Así, las células cargadas con Tskb20 se marcaron con altos niveles de CFSE (CFSE_{hi} del inglés *high*), la población cargada con Tskb18 se tiñó con eFluor670, las células cargadas con Pa8 se marcaron con bajos niveles de CFSE (CFSE_{lo} del inglés *low*) y las células sin cargar se tiñeron con CFSE e eFluor670 conjuntamente. Cabe destacar que las células esplénicas que fueron utilizadas para realizar la transferencia provenían de ratones de una cepa mutante que no presenta linfocitos B esplénicos. Esto es importante debido a que la transferencia de linfocitos B al grupo de animales inyectados con α CD20, podría provocar una depleción de los mismos, que resultaría en

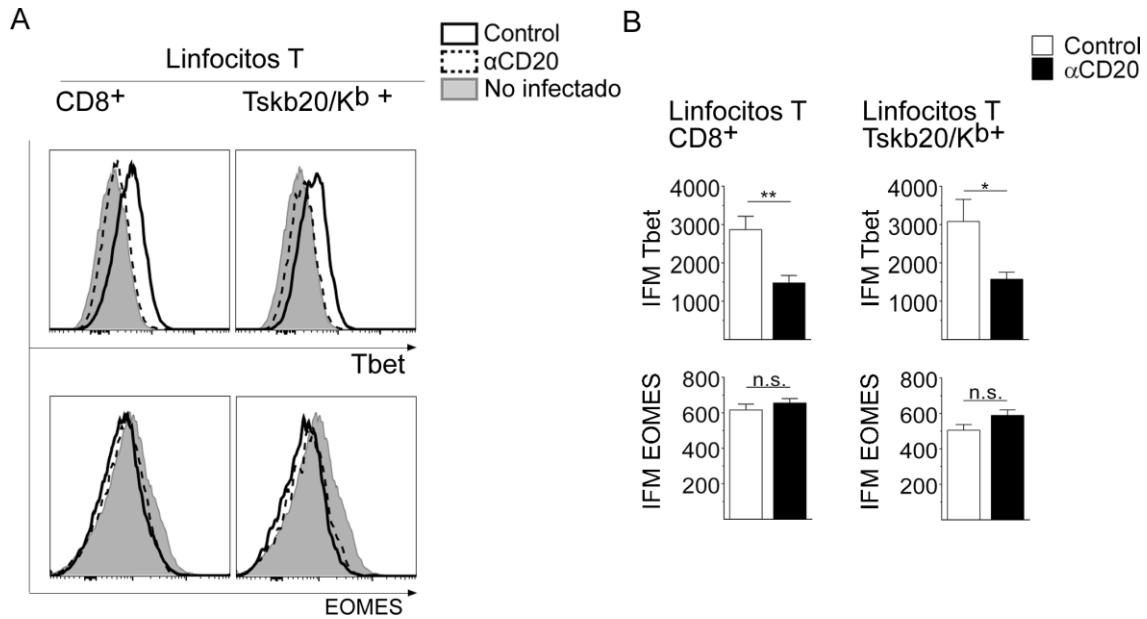


Figura 21: Los linfocitos T CD8⁺ presentes en animales infectados carentes de linfocitos B presentaron una disminución en la expresión de Tbet. Las células de bazo de ratones inyectados con el anticuerpo control (Control) o con αCD20 fueron obtenidas al día 20 pi (n=6 por cada grupo). Paralelamente, muestras de bazo de animales sin infectar fueron procesados. Las células fueron incubadas con el tetrámero y los Acm anti-CD8, anti-Tbet y anti-EOMES murinos marcados con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. Para realizar los análisis se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos T CD8⁺ o CD8⁺Tskb20/Kb⁺. A) Histogramas representativos de la expresión de Tbet y EOMES en los linfocitos T CD8 totales y específicos. La línea negra continua corresponde a la expresión en el animal control y la línea negra discontinua corresponde a la expresión en el grupo inyectado con αCD20. El histograma gris relleno corresponde a la expresión en el grupo no infectado. B) Gráficos de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de la expresión los marcadores medidos en A) en el grupo control infectado (barras blancas) y depletados infectados (barras negras). Los datos se muestran como el valor promedio ± DE. La significancia de las diferencias de cada población entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de test-T de dos colas. La significancia de las diferencias estadísticamente significativas se indican con * y ** (p<0,05 y p<0,01 respectivamente) (n.s.= no significativo).

una sobreestimación de la citotoxicidad evaluada. Las células cargadas y teñidas fueron transferidas en igual proporción, y los bazo e hígados de los animales infectados fueron obtenidos a las 5 horas post transferencia para la evaluación del porcentaje remanente de cada una de las poblaciones descritas, mediante su medición por citometría de flujo.

Como era de esperar, el porcentaje de cada población recuperada en el animal no infectado, quien no debería tener ningún grado de citotoxicidad específica, se conservó casi intacto respecto a la proporción inicial inyectada (25% de cada una de las poblaciones) (Figura 22B). Contrariamente, al analizar las poblaciones recuperadas en los dos grupos de animales infectados, se puede observar que la población cargada con el péptido Tskb20 se encuentra significativamente disminuida (Figura 22B). Al individualizar el análisis sobre cada población de células cargadas, se observó en el bazo y en el hígado una disminución significativa en la frecuencia de células cargadas con Tskb20 o con Tskb18 en los animales control, respecto de los carentes de linfocitos

B, los cuales exhiben una mayor frecuencia de estas células (Figura 22B). Este dato indica que al haber mayor cantidad de células, el animal infectado tiene menor capacidad lítica sobre dicha población, reflejando una menor capacidad citotóxica por parte de los linfocitos T CD8+ en ausencia de linfocitos B. Es importante señalar que la mayor frecuencia de células cargadas con Tskb20 y Tskb18 detectadas en los animales inyectados con α CD20 puede deberse tanto a una disminución en la frecuencia de linfocitos T CD8+ específicos, como a la disfunción celular determinada previamente *in vitro* (Figura 19 y 20). Finalmente, la disminución de las células cargadas con el péptido Pa8 fue muy baja e indistinta entre los grupos de animales infectados (Figura 22C).

En conjunto, los resultados obtenidos de ambos ensayos de funcionalidad confirman una defectuosa respuesta por parte de los linfocitos T CD8+. La disminución en la frecuencia, el número y la funcionalidad de los linfocitos T CD8 totales y específicos podrían explicar el mayor parasitismo tisular observado en los animales depletados de linfocitos B (Figura 6).

Los hallazgos descritos en este capítulo sugieren que, en la infección experimental con *T. cruzi*, los linfocitos B poseen una función clave que afecta la respuesta de los linfocitos T CD8, ya que la depleción de estas células mediante la administración de α CD20, influye negativamente en la generación de una adecuada respuesta citotóxica.

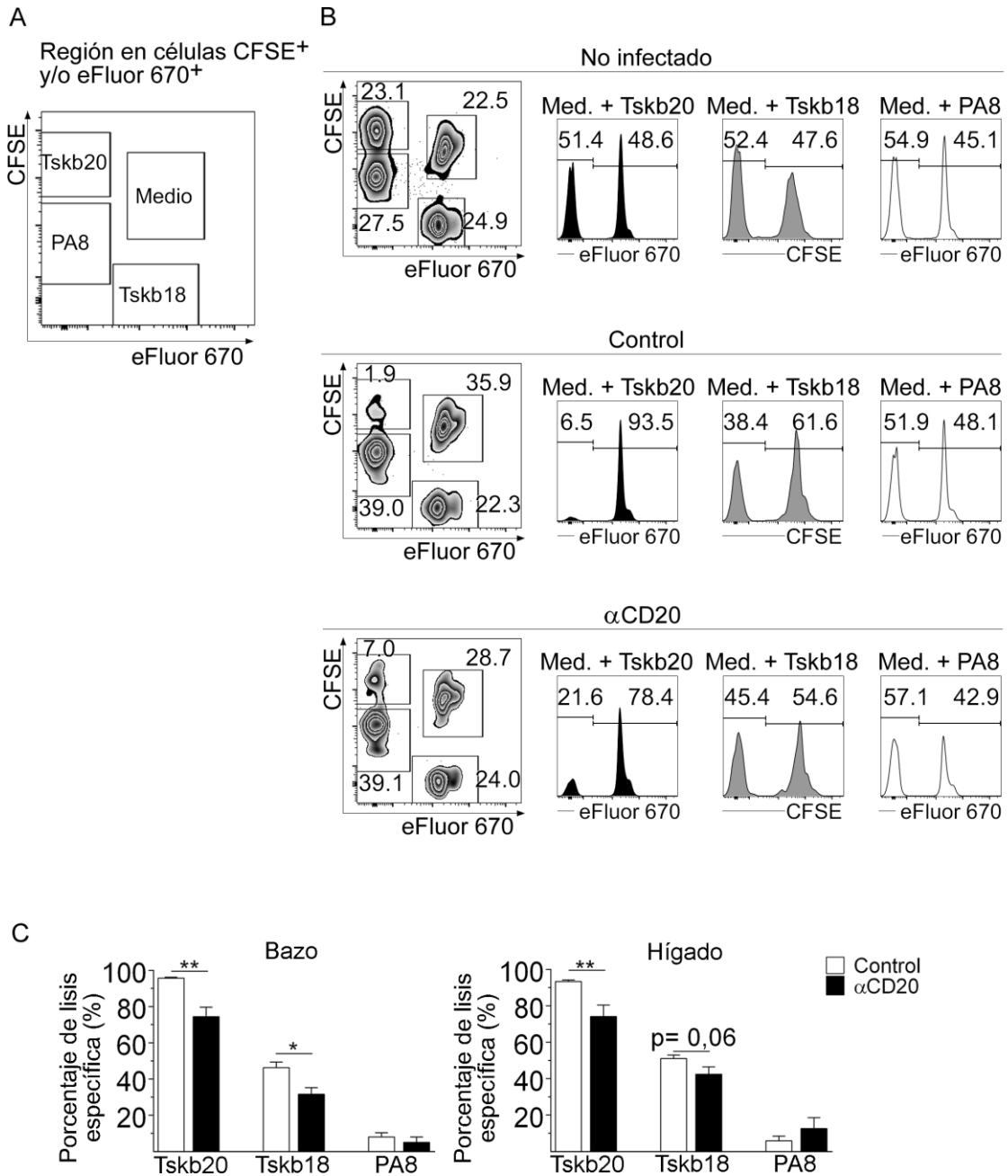


Figura 22: Los animales infectados carentes de linfocitos B presentan una menor capacidad citotóxica por parte de los linfocitos T CD8⁺ esplénicos y hepáticos. Las células de bazo e hígado de ratones no infectados o de los grupos control y depletados de linfocitos B del día 20 pi (n=3 para no infectados y 5 para infectados de cada grupo), fueron obtenidas a las 5 horas de haberles realizado la transferencia de una mezcla de células cargadas con antígenos parasitarios y teñidas. Las células obtenidas fueron analizadas por citometría de flujo. Para realizar los análisis se seleccionó la región de células que expresaban CFSE y/o eFluor670. A) Esquema representativo con la estrategia de las regiones examinadas B) Gráficos de dos parámetros mostrando el remanente de las cuatro poblaciones celulares en el bazo a las 5 horas de ser transferidas. A la derecha se muestran en histogramas las comparaciones realizadas para cada péptido en relación al medio. Los números de los gráficos corresponden a la frecuencia de células en cada región marcada. C) Porcentaje de lisis específica de cada población de células cargadas. En los gráficos de barras, las barras blancas corresponden a los animales inyectados con el anticuerpo control y las barras negras corresponden a los animales inyectados con α CD20. La significancia de las diferencias de cada población entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de test-T de dos colas. Las diferencias estadísticamente significativas entre los animales Control y α CD20 se indican con * y ** (p \leq 0,05 y p \leq 0,01 respectivamente).

CONCLUSIONES II

Los animales inyectados con α CD20 no presentan diferencias en la parasitemia respecto a los controles, sin embargo presentan una mayor replicación parasitaria en el hígado, bazo y corazón.

Mientras que los linfocitos T CD8+ totales y específicos esplénicos del grupo control muestran una curva de respuesta clásica, comprendiendo las fases de expansión y contracción, la frecuencia de estas poblaciones celulares no se sostiene en los animales desprovistos de linfocitos B. Consecuentemente, los animales carentes de linfocitos B presentan una disminución en la frecuencia y número de linfocitos T CD8+ totales y específicos en comparación al grupo control a los 20 dpi.

La frecuencia de linfocitos T CD8+ específicos contra *T. cruzi* está significativamente disminuida en el hígado y la sangre de los animales infectados carentes de linfocitos B, al día 20 pi.

En ausencia de linfocitos B hay una disminución en el porcentaje y número de la población de linfocitos T CD8+ efectores, y una disminución en el número de linfocitos T CD8+ de memoria.

Los linfocitos T CD8+ provenientes de los animales carentes de linfocitos B presentan una menor proliferación celular y características compatibles con un mayor grado de apoptosis celular.

Los linfocitos T CD8+ generados en ausencia de linfocitos B presentan una disminución del fenotipo de activación y un aumento de receptores inhibitorios.

La función efectora de los linfocitos T CD8+, evaluada a través de la capacidad de producir citoquinas y degranular o de ejercer citotoxicidad de células blanco, se encuentra notablemente disminuida en los animales depletados de linfocitos B. Además, los linfocitos T CD8+ del grupo administrado con α CD20, presentan una marcada disminución en la expresión del factor de transcripción Tbet, clave para la funcionalidad de estas células.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta sección demuestran que la respuesta citotóxica está disminuida en los animales depletados de linfocitos B, comprometiendo el control de la infección.

RESULTADOS III

Estudio del mecanismo involucrado en promoción de la respuesta de linfocitos T CD8+ por parte de los linfocitos B

En función de los resultados que muestran una disminución en la magnitud de la respuesta de linfocitos T CD8+, así como un cambio en el fenotipo y una reducida funcionalidad en los animales carentes de linfocitos B, el siguiente y último objetivo abordado en esta tesis fue el de evaluar el mecanismo involucrado en esta regulación celular.

La respuesta citotóxica se encuentra afectada en los animales depletados de linfocitos B al día 12 dpi

Como se mencionó en la sección Introducción de este manuscrito, los linfocitos B poseen la capacidad de presentar antígenos favoreciendo la iniciación de la respuesta de los linfocitos T (revisado por [3]). Debido a que en el modelo experimental utilizado hasta este momento, el tratamiento con el anticuerpo α CD20 condujo a una disminución significativa o ausencia de los linfocitos B desde el inicio de la infección (0 dpi), la presentación antigénica por parte de los linfocitos B no podía ser llevado a cabo. Por lo tanto, con el objetivo de evaluar si la falta de respuesta de los linfocitos T CD8+ se debe a falta de presentación antigénica o a una falla en sostener la sobrevivencia de estas células citotóxicas, en una primera etapa se planteó un nuevo esquema de depleción. En este caso el anticuerpo monoclonal α CD20 fue inyectado una vez que la respuesta de linfocitos T CD8+ específica ya había sido inducida casi en su totalidad (12 dpi), como se mostró previamente (Figura 8). Por lo tanto, al haberse desarrollado la respuesta de linfocitos T CD8+ específica, la presentación antigénica por parte de los linfocitos B, si es que existió, ya no cumpliría un rol esencial y, por lo tanto, los efectos observados en este grupo de ratones serían independientes de este proceso. Inicialmente, se realizó el estudio del porcentaje de linfocitos B presentes a los 20 dpi. Para ello, células de bazo de ratones inyectados con anticuerpo control, con α CD20 al día -8 pi (esquema de la Figura 2) o al día 12 pi (esquema de la Figura 23A), fueron obtenidas a los 20 dpi. Posteriormente, para controlar la frecuencia de linfocitos B la cual refleja la eficiencia del tratamiento, las células fueron incubadas con los Acm anti-B220 y anti-CD19 marcados con diferentes fluorocromos y analizados por citometría de flujo.

El análisis mostró una disminución significativa en el porcentaje de células B220+CD19+ en ambos grupos de ratones tratados con α CD20, independientemente del momento de la inyección. Los resultados se compararon con los datos obtenidos

en el grupo de animales administrados con el anticuerpo control, al día 20 pi (Figura 23 B y C).

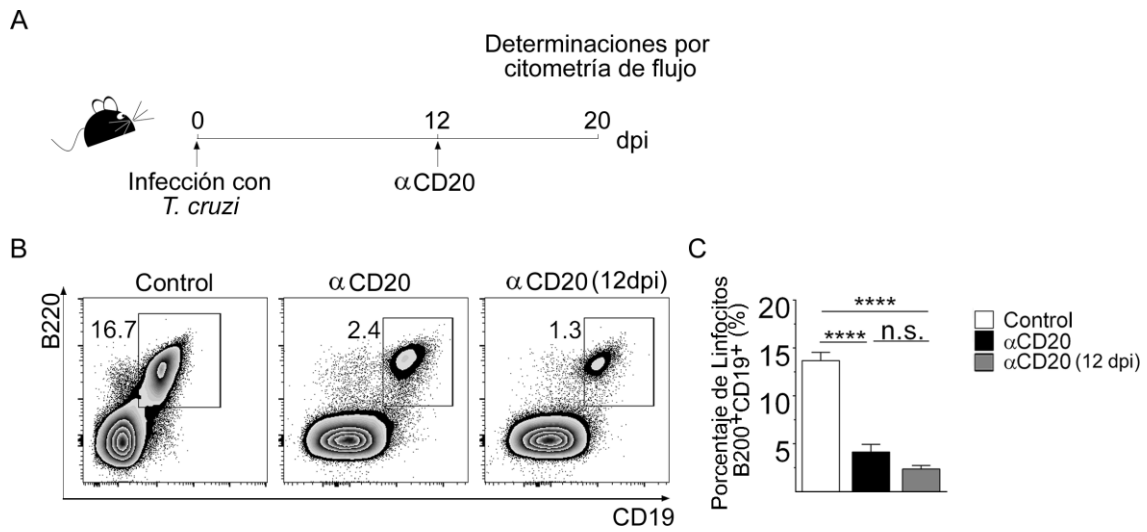


Figura 23: La administración de α CD20 al día 12pi condujo a una depleción de los linfocitos B220+CD19+. Las células de bazo de ratones inyectados con un anticuerpo control o con α CD20 al día -8 (grupo “ α CD20”) y 12 pi (grupo “ α CD20 (12 dpi)”) e infectados, fueron obtenidas a los 20 dpi (n=5 para cada grupo). Posteriormente las células fueron incubadas con Acm anti-CD19 y anti-B220 marcado con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A) Representación esquemática del modelo de depleción, en el cual los ratones son inyectados con α CD20 a los 12 dpi. B) Gráficos de dos parámetros representativos de la frecuencia de linfocitos B220+CD19+ al día 20 pi. C) Análisis estadístico del porcentaje de linfocitos B220+CD19+ en bazo de los ratones control (barra blanca), depletados al día -8 pi (barra negra) o al día 12 pi (barra gris). La significancia de las diferencias entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de una vía seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con **** ($p \leq 0,0001$) (n.s.= no significativo).

Seguidamente, decidimos evaluar las características de la respuesta de linfocitos T CD8+ específicos con el nuevo esquema de depleción de los linfocitos B a los 12 dpi. Para ello, muestras de bazo de los tres grupos analizados en la Figura 23, fueron obtenidos al día 20 pi. Seguidamente, las células fueron incubadas con los Acm anti-CD8 y el tetrámero específico para Tskb20 marcados con diferentes fluorocromos y analizados mediante citometría de flujo.

Los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa en el porcentaje y número de la población de linfocitos T CD8+ específicos en los animales depletados al día 12 pi, en comparación al grupo control (Figura 24A y B). Comparando estos datos con los obtenidos con animales que fueron infectados cuando no tenían linfocitos B, no observamos diferencias en cuanto a la frecuencia de linfocitos T CD8+ específicos para Tskb20 (Figura 24A y B). Estos resultados muestran que la disminución en la respuesta de linfocitos T CD8+ específicos en los animales depletados, es independiente de la capacidad que poseen los linfocitos B de presentar antígenos, ya

que ocurre una vez que la presentación fue realizada y la respuesta citotóxica establecida.

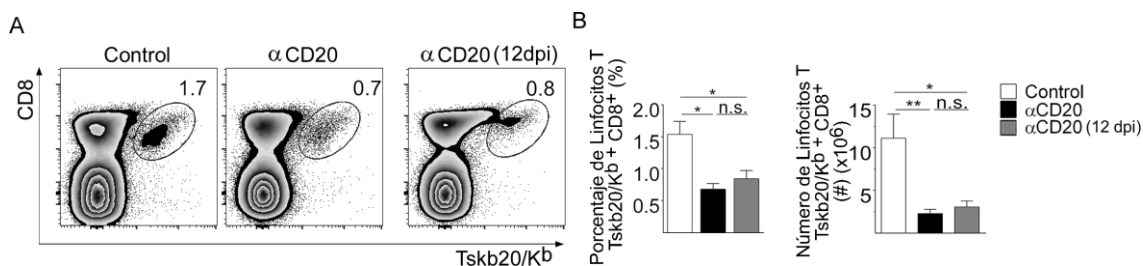


Figura 24: Los ratones depletados de linfocitos B a los 12dpi exhibieron una respuesta reducida de linfocitos T CD8+ específicos contra *T. cruzi*. Las células de bazo de ratones administrados con el anticuerpo control (Control) o con αCD20 al día -8 y 12 pi e infectados, fueron obtenidas a los 20 dpi (n=5 por cada grupo). Posteriormente, las células fueron incubadas con el Acm anti-CD8 y el tetrámero, marcado con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A) Gráficos de dos parámetros representativos de la frecuencia de linfocitos Tskb20/Kb+CD8+. B) Porcentaje y número de la población marcada en A), en los animales control (barras blancas) y depletados al día -8 pi (barras negras) o 12 pi (barras grises). La significancia de las diferencias entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con * y ** (p<0,05 y p<0,01 respectivamente) (n.s.= no significativo).

Posteriormente al estudio de la frecuencia de linfocitos T CD8+ específicos, evaluamos las características fenotípicas de estas células en los animales depletados en el día 12 pi. Para ello, en los grupos de animales control y depletados anterior y posteriormente a la infección, se realizó la medición de las poblaciones celulares esplénicas con fenotipo efector, utilizando los marcadores previamente mencionados en las Figuras 11, 12, 13 y 14.

Como se puede observar en la figura 25A, los linfocitos T CD8+ totales provenientes de los animales depletados al día 12 pi, presentaron un porcentaje y número de células con fenotipo Eff/Em (CD62L-CD44+) disminuido en comparación con el grupo de animales sin depletar. No observamos diferencias en la población de linfocitos T CD8+ totales con el fenotipo Eff/Em (CD62L-CD44+) entre los dos grupos de animales depletados (Figura 25A). En el análisis de la población de linfocitos T CD8+ de memoria (CD62L+CD44+) no se observaron diferencias en el porcentaje, aunque sí una disminución significativa del número, de células con este fenotipo en los animales depletados a los 12 dpi en comparación con el grupo control (Figura 25A). Por otro lado, cuando se evaluó la población de linfocitos T CD8+ específicos con fenotipo efector (CD62L-CD44+), se observó una disminución pequeña aunque no significativa en el porcentaje en los animales depletados al día 12 pi, en comparación con el grupo control (Figura 25B). Contrariamente, el número de linfocitos T CD8+ específicos con fenotipo Eff/Em se encontró marcadamente disminuido en los ratones depletados al día 12pi, en comparación con el grupo control (Figura 25B).

En correlación con los resultados mencionados, la frecuencia y número de

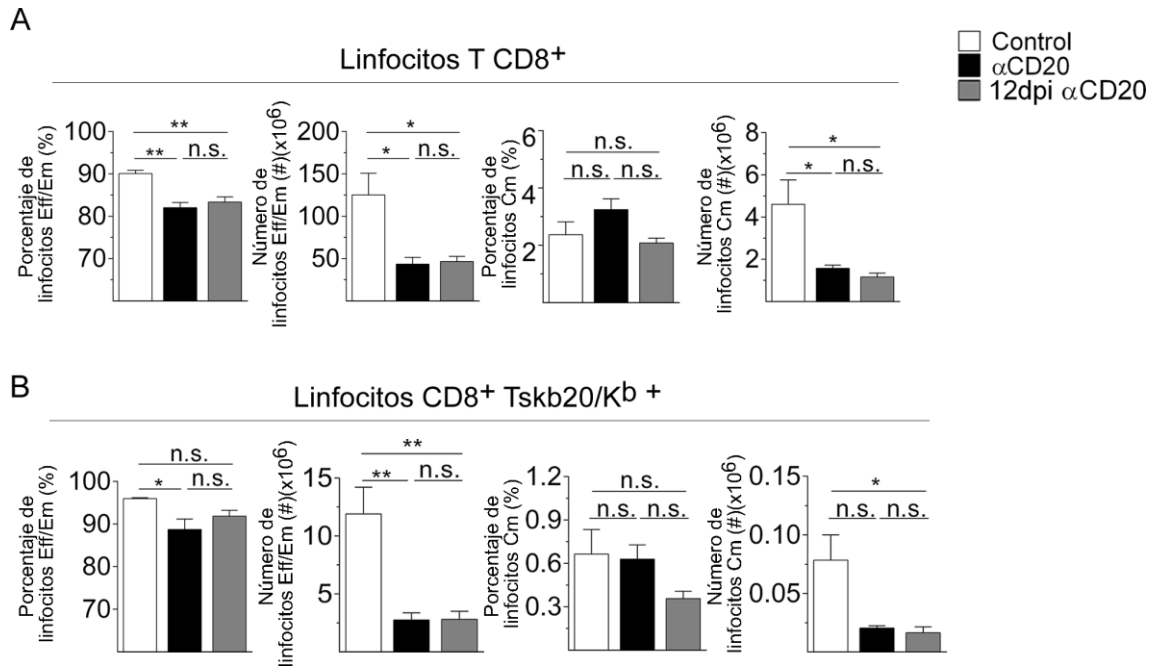


Figura 25: La disminución de la respuesta de linfocitos T CD8⁺ Eff/Em y de Cm ocurre independientemente del momento de la depleción de los linfocitos B. Las células de bazo de ratones administrados con el anticuerpo control (Control) (barras blancas) o con α CD20 al día -8 (barras negras) o al día 12 pi (barras grises) e infectados, fueron obtenidas a los 20 dpi (n=4-5 por cada grupo). Posteriormente, las células fueron incubadas con el tetrámero y los Acm anti-CD8, anti-CD62-L y anti-CD44 murinos, marcados con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A,B) Porcentaje y número de las diferentes poblaciones efectoras y de memoria en los linfocitos T CD8⁺ totales (A) y específicos (B). La significancia de las diferencias entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con * y ** ($p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$ respectivamente) (n.s.= no significativo).

linfocitos T CD8⁺ totales y específicos con fenotipo efector de corta vida (CD44⁺, KLRG-1⁺, IL-7R α -) se encontraron significativamente disminuidos en el grupo de animales depletados al día 12pi, en comparación con el grupo control (Figura 26A y B). Cabe señalar que no se evidenciaron diferencias en cuanto al fenotipo de la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ entre los dos grupos de animales depletados de linfocitos B (Figura 25 y 26). Además, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ totales y específicos con fenotipo de células precursoras de memoria no presentó diferencias, aunque una disminución significativa en el número de estas células fue observada en el grupo de animales depletados al día 12 pi en comparación con el grupo control (Figura 26A y B).

Seguidamente, la expresión de los receptores inhibitorios LAG-3 y TIGIT fue evaluada en los linfocitos T CD8⁺ totales y específicos al día 20 pi. Para ello, células esplénicas de los ratones control y de ambos grupos carentes de linfocitos B fueron obtenidas al día 20 pi e incubadas con los Acm anti-CD8, anti-LAG-3, anti-TIGIT y el tetrámero específico. Posteriormente las células marcadas fueron analizadas por citometría de flujo.

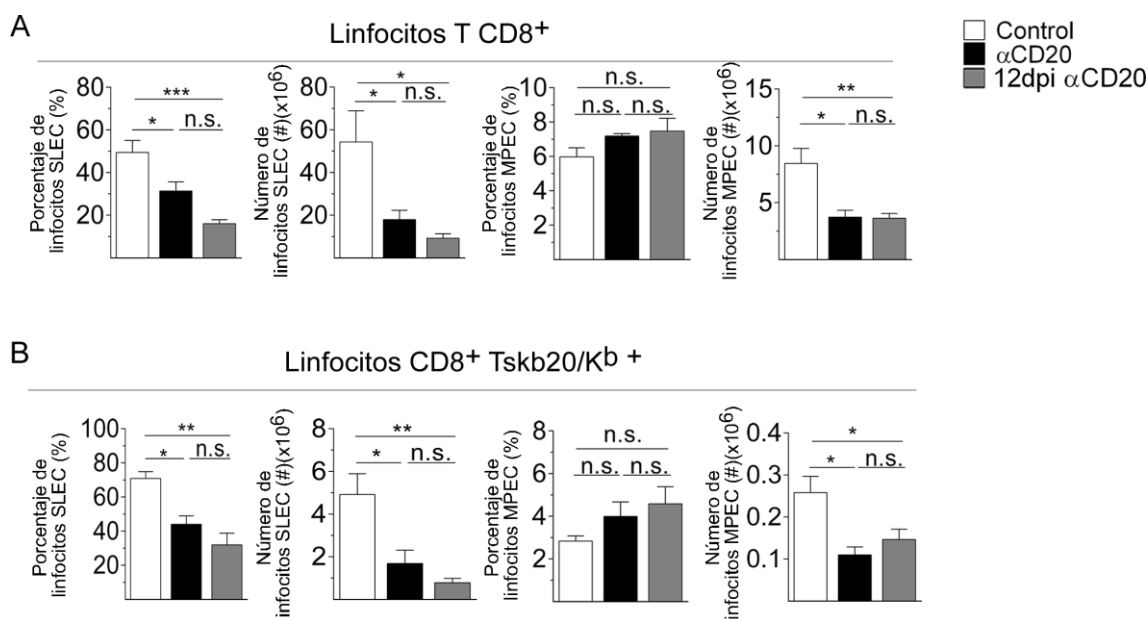


Figura 26: La disminución de la respuesta de linfocitos T CD8+ efectoros y de memoria ocurre independientemente del momento de la depleción de los linfocitos B. Las células de bazo de ratones administrados con el anticuerpo control (Control) (barras blancas) o con αCD20 al día -8 (barras negras) o al día 12 pi (barras grises) e infectados, fueron obtenidas a los 20 dpi (n=4-5 por cada grupo). Posteriormente, las células fueron incubadas con el tetrámero y los Acm anti-CD8, anti-CD44, anti-KLRG-1 y anti-IL-7Rα murinos, marcados con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A,B) Porcentaje y número de las diferentes poblaciones efectoras y de memoria en los linfocitos T CD8+ totales (A) y específicos (B). La significancia de las diferencias entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con *, ** y *** (p≤0,05; p≤0,01 y p≤0,001 respectivamente) (n.s.= no significativo).

En la Figura 27A y B se puede observar que la expresión de los receptores inhibitorios LAG-3 y TIGIT en los linfocitos T CD8+ totales y específicos se encontraban aumentados en los ratones depletados a los 12 dpi, en comparación al grupo control. Los niveles de estos receptores inhibitorios fueron significativamente mayores en los linfocitos T CD8+ específicos de los animales depletados al día 12 pi en comparación con aquellos en los que la depleción había sido realizada previa a la infección (Figura 27A y B).

Para completar la caracterización de la respuesta citotóxica en los animales en los que la depleción de linfocitos B había sido llevado a cabo al día 12 pi, se realizó el ensayo de funcionalidad *in vitro* descrito en la Figura 19. Para ello, las células esplénicas de los tres grupos experimentales fueron obtenidas al día 20 pi para ser cultivadas durante 5 horas en medio, con el estímulo policlonal o con el péptido específico. Adicionalmente, el Acm anti-CD107a y la monensina fueron agregados a las diferentes condiciones de cultivo. Transcurrido el cultivo, las células fueron marcadas con el Acm anti-CD8 y fijadas para la marcación con los Acm anti-IFNγ y anti-TNF. Las células teñidas fueron analizadas por citometría de flujo.

En la evaluación de la funcionalidad bajo el estímulo policlonal, se pudo observar que los linfocitos T CD8+ de los animales depletados a los 12 dpi presentaban

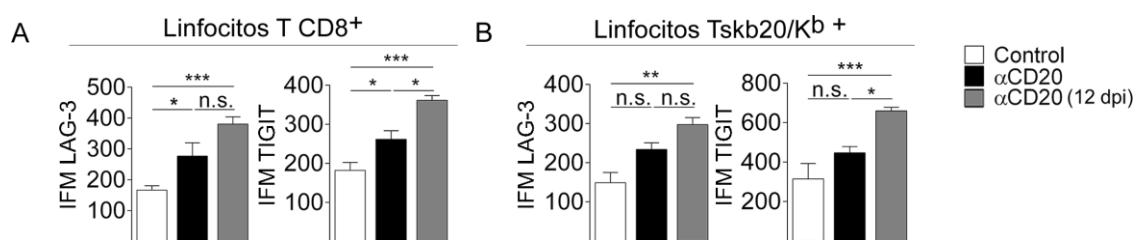


Figura 27: La depleción de linfocitos B realizada al día 12 pi induce un aumento en la expresión de los receptores inhibitorios en los linfocitos T CD8+. Las células de bazo de ratones administrados con el anticuerpo control (Control) (barras blancas) o con αCD20 al día -8 (barras negras) o al día 12 pi (barras grises) e infectados, fueron obtenidas a los 20 dpi (n=4-5 por cada grupo). Posteriormente, las células fueron incubadas con el tetrámero y los Acm anti-CD8, anti-LAG-3 y anti-TIGIT marcados con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A,B) Intensidad de fluorescencia media de los receptores medidos en los linfocitos T CD8+ totales (A) y específicos para Tskb20 (B). La significancia de las diferencias entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con *, ** y *** (p≤0,05; p≤0,01 y p≤0,001 respectivamente) (n.s.= no significativo).

una reducción en el porcentaje de células totales productoras de IFN γ , en comparación con el grupo control (Figura 28A). De manera interesante, el porcentaje de linfocitos T CD8+ productores de esta citoquina fue mayor en el grupo de animales depletados de linfocitos B al día 12 pi, en comparación con aquellos depletados 8 días previos a la infección (Figura 28A). A diferencia de lo descrito para el IFN γ , los linfocitos T CD8+ productores de TNF no se encontraron disminuidos en los animales depletados de linfocitos B al día 12 pi en comparación con el grupo control (Figura 28A). Adicionalmente, se observó una disminución en el porcentaje de linfocitos T CD8+ capaces de degranular (CD107a+) en el grupo de animales depletados al día 12 pi, en comparación con el grupo control (Figura 28A). Por otra parte, los resultados obtenidos bajo el estímulo específico mostraron una disminución en el porcentaje de linfocitos T CD8+ productores de ambas citoquinas o capaces de degranular en el grupo de animales depletados a los 12dpi en comparación a los animales control (Figura 28B).

Dado que la presencia del factor de transcripción Tbet se relaciona con la capacidad de secreción de IFN γ y por ende de la capacidad funcional de los linfocitos T CD8+, seguidamente, la expresión de Tbet fue evaluada en los linfocitos T CD8+ de todos los grupos experimentales. Para ello, esplenocitos de los tres grupos evaluados fueron obtenidos a los 20 dpi, incubados con el tetrámero y los Acm anti-CD8 y anti-Tbet marcados con diferentes fluorocromos para su posterior análisis por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos mostraron que los linfocitos T CD8+ totales y específicos para antígenos de *T. cruzi* de los animales depletados de linfocitos B (independientemente del momento de la depleción), presentaron una disminución significativa en la IFM de Tbet en comparación con las mismas células presentes en el grupo control (Figura 29).

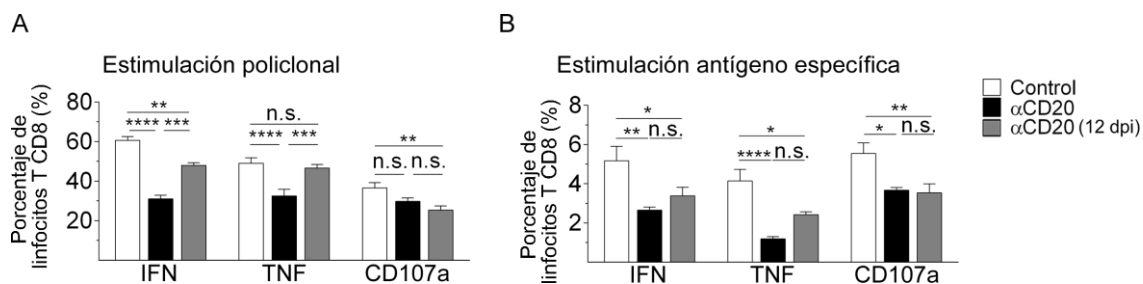


Figura 28: Los linfocitos T CD8+ totales presentaron una disminución en la frecuencia de células secretantes de IFN γ en los animales inyectados con α CD20 a los 12dpi. Las células de bazo de ratones administrados con el anticuerpo control (Control, barras blancas) o con α CD20 al día -8 (barras negras) o al día 12 pi (barras grises) e infectados, fueron obtenidas a los 20 dpi (n=5 por cada grupo). Posteriormente, fueron incubadas por 5 horas en presencia de monensina y el Acm anti-CD107a bajo las condiciones de medio (no estimuladas), o con el estímulo (A) policlonal o (B) específico de *T. cruzi*. Posteriormente, las células fueron incubadas con los Acm anti-CD8, anti-IFN γ y anti-TNF murinos marcados con diferentes fluorocromos. Las células marcadas fueron analizadas por citometría de flujo. Para realizar los análisis se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos T CD8+. A los valores obtenidos para ambos estímulos, se les descontó el valor correspondiente al cultivo sin estímulo. A,B) Gráficos de la frecuencia de células totales productoras de IFN γ , TNF o que degranulan (CD107a+). La significancia de las diferencias entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con *, **, *** y **** ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ y $p < 0,0001$ respectivamente) (n.s.= no significativo).

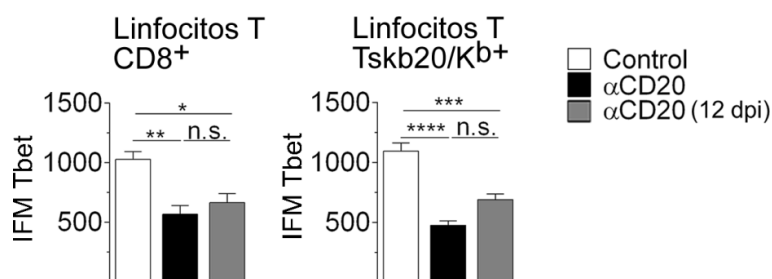


Figura 29: La administración de α CD20 a los 12 dpi conduce a una disminución en la expresión de Tbet en los linfocitos T CD8+ totales y específicos. Las células de bazo de ratones administrados con el anticuerpo control (Control) (barras blancas) o con α CD20 al día -8 (barras negras) o al día 12 pi (barras grises) e infectados, fueron obtenidas a los 20 dpi (n=5 por cada grupo). Posteriormente, las células fueron incubadas con el tetrámero y los Acm anti-CD8 y anti-Tbet murinos marcados con diferentes fluorocromos. Las células marcadas fueron analizadas por citometría de flujo. Para realizar los análisis se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos T CD8+ o CD8+Tskb20/Kb+ según cada caso y se analizó la intensidad de fluorescencia media (IFM) de Tbet. La significancia de las diferencias entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con *, **, *** y **** ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ y $p < 0,0001$ respectivamente) (n.s.= no significativo).

En resumen, debido a los hallazgos similares observados en cuanto a la magnitud, fenotipo y funcionalidad de la respuesta de linfocitos T CD8+, observada entre los grupos de animales depletados desde el inicio o al día 12 pi, podemos concluir que la presentación antigénica por parte de los linfocitos B no cumpliría una

función relevante en el desarrollo de la respuesta citotóxica antiparasitaria. Por lo tanto el siguiente paso realizado fue evaluar la participación de algún factor soluble secretado por los linfocitos B como el mecanismo responsable de la interacción entre estas células y los linfocitos T CD8+.

En los ratones inyectados con α CD20 se observa una marcada disminución de células productoras de IL-6 e IL-17A

Debido a los numerosos reportes que evidencian la capacidad que poseen los linfocitos B de producir diferentes citoquinas, dependiendo del contexto en el que se encuentran, y que éstas pueden modular la respuesta inmune de otras poblaciones celulares, nos enfocamos en evaluar las citoquinas que producían los linfocitos B en el contexto de la infección con *T. cruzi*. Para ello, células de bazo fueron obtenidas a lo largo de la infección (0, 7, 15, 20, 30 y 40 días pi). Posteriormente, las células fueron cultivadas *in vitro* con el estímulo policlonal (PMA/Ionomicina), en presencia de brefeldina y monensina para frenar la liberación de las citoquinas durante 5 horas. Luego del cultivo, las células fueron marcadas con el Acm anti-CD19. Posteriormente a la fijación y permeabilización, las células fueron teñidas con los Acm anti-IL-6, anti-IL-17A, anti-IL10, anti-IFN γ y anti-TNF. En el análisis realizado, la población de células que expresaba CD19 con diferente intensidad (CD19+) se definió como progenie de “linfocitos B” y la que no lo hacía (CD19-) como “células no B” (dentro de la cual se encontrarían otras poblaciones como los linfocitos T, células NK, NKT, células dendríticas, macrófagos, etc.).

En la Figura 30 se muestra un dot plot representativo en donde se observa que linfocitos B con baja expresión de la molécula CD19 (CD19^{low}, del inglés *low*), obtenidos en el día 15 pi, son capaces de producir las citoquinas IL-6 e IL-17A. Por otra parte, pudimos evidenciar una pequeña población de linfocitos B productores de IL-10, IFN γ y TNF, la cual parece ser despreciable con respecto a las células no B productoras de dichas citoquinas (Figura 30).

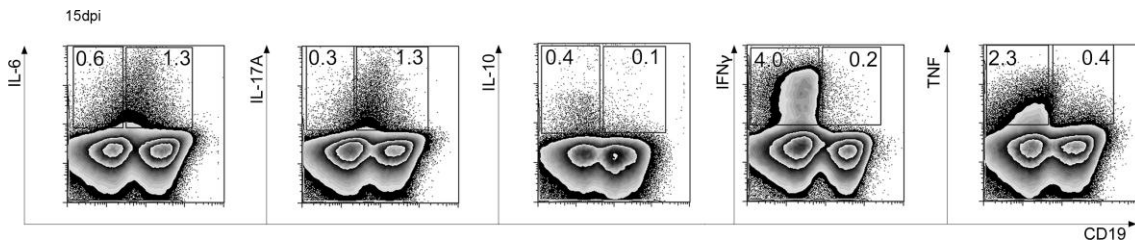


Figura 30: Los linfocitos B son capaces de secretar IL-6 e IL-17A a los 15dpi. Células esplénicas de ratones C57BL/6 infectados fueron obtenidas a los 15 dpi. Posteriormente las células fueron incubadas con un estímulo policlonal de linfocitos (PMA/Ionomicina) en presencia de brefeldina y monensina durante 5 horas. Luego, las células fueron marcadas con los Acm anti-CD19, anti-IL-6, anti-IL-17A, anti-IL10, anti-IFN γ y anti-TNF para ser evaluadas por citometría de flujo. Gráficos de dos parámetros representativos del porcentaje de linfocitos B (región CD19+ *derecha*) y “células no B” (región CD19- *izquierda*) capaces de producir las diferentes citoquinas a los 15 dpi.

En la Figura 31 se observa que la frecuencia de linfocitos B secretantes de IL-6 e IL-17A es significativamente mayor al día 15 pi y que se mantiene elevada, en comparación con la frecuencia de las células no B productoras de IL-6 e IL-17A, hasta los días 20 y 30 pi. Pudimos evidenciar que la pequeña población de linfocitos B productores de IL-10 fue significativamente menor a la fracción de células no B productoras de dicha citoquina, entre el día 15 y 20pi (Figura 31). A pesar de que se había observado una pequeña población de células CD19+ capaces de producir IFN γ y TNF a lo largo de toda la infección, ésta fue despreciable en comparación con el resto de las células esplénicas no B capaces de producir las mismas (Figura 31).

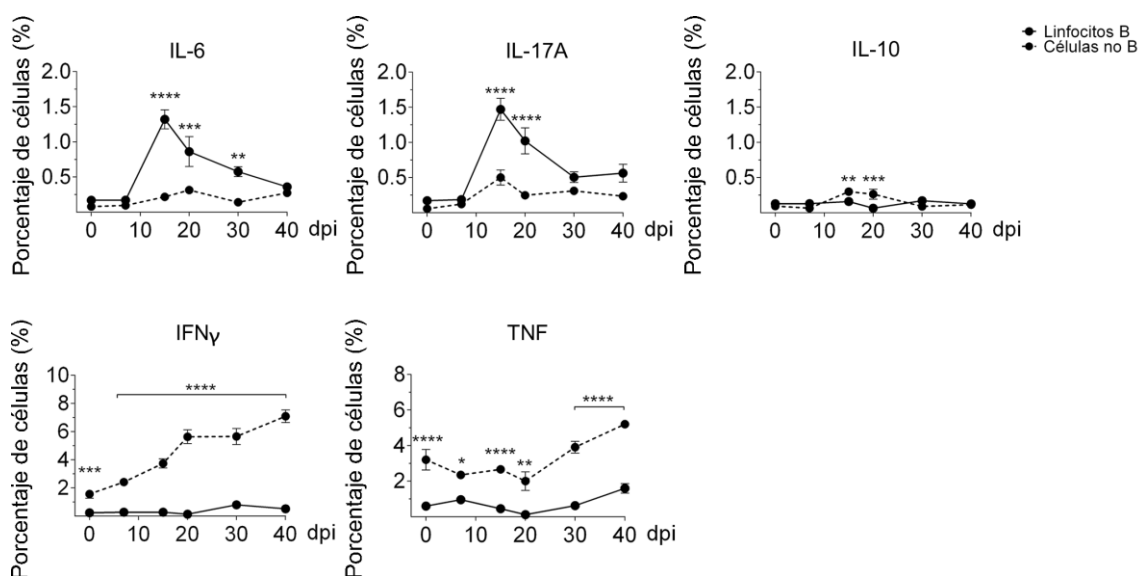


Figura 31: La frecuencia de linfocitos B capaces de producir IL-6 e IL-17A fue mayor que el resto de las poblaciones esplénicas no-B capaces de producir dichas citoquinas. Células esplénicas de ratones C57BL/6 infectados fueron obtenidas a los 0, 7, 15, 20, 30 y 40 dpi. Posteriormente las células fueron incubadas con un estímulo policlonal de linfocitos (PMA/Ionomicina) en presencia de brefeldina y monensina durante 5 horas. Luego, las células fueron marcadas con los Acm anti-CD19, anti-IL-6, anti-IL-17A, anti-IL10, anti-IFN γ y anti-TNF para ser evaluadas por citometría de flujo. Porcentaje de linfocitos B (líneas negras continuas) y de células no B (líneas negras discontinuas) productoras de las diferentes citoquinas a diferentes días pi. La significancia de las diferencias entre las poblaciones celulares fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con *, **, *** y **** ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$ y $p \leq 0,0001$ respectivamente).

Con el objetivo de confirmar el origen celular de la fuente de IL-6 e IL-17A, las células productoras de ambas citoquinas fueron evaluadas en los animales depletados de linfocitos B. Para ello, células esplénicas de animales inyectados con el anticuerpo control o con α CD20, previo a la infección, fueron obtenidas al día 15pi. Posteriormente las células fueron cultivadas y procesadas al igual que en la Figura 30.

Como era de esperar, en los animales depletados de linfocitos B se observó una ausencia de células CD19 capaces de producir ambas citoquinas (Figura 32). Cabe

añadir que al evaluar las poblaciones productoras de IL-17A en los animales depletados, la población de células no B productoras de esta citoquina también se vio reducida (Figura 32, paneles de la derecha).

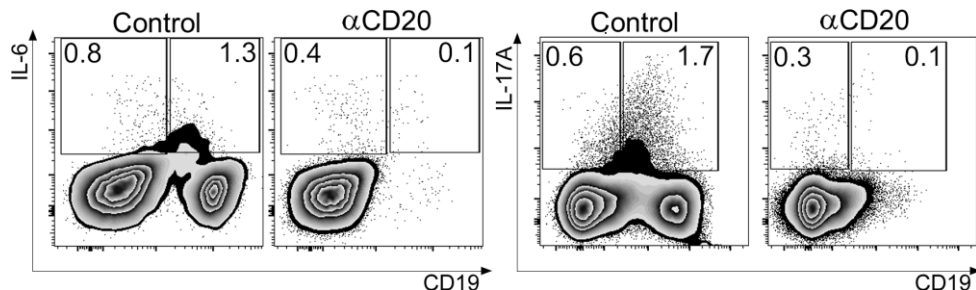


Figura 32: En ausencia de linfocitos B, la población de células productoras de IL-6 e IL-17A se vio marcadamente disminuida. Células esplénicas de ratones inyectados con el anticuerpo control o con α CD20 e infectados fueron obtenidas a los 15 dpi. Posteriormente las células fueron incubadas con un estímulo policlonal de linfocitos (PMA/Ionomicina) en presencia de brefeldina y monensina durante 5 horas. Luego, las células fueron marcadas con los Acm anti-CD19, anti-IL-6 y anti-IL-17A para ser evaluadas por citometría de flujo. Gráficos de dos parámetros representativos del porcentaje de linfocitos B (región CD19+ derecha) y "células no B" (región CD19- izquierda) capaces de producir las diferentes citoquinas a los 15 dpi.

Posteriormente, nos propusimos evaluar la concentración de IL-6 e IL-17A circulante en la sangre de los animales control y depletados. Para ello obtuvimos muestras de sangre anticoagulada de ambos grupos experimentales a los 15 y 20 dpi. Posterior a la separación del plasma, se realizó un ensayo de ELISA para medir la concentración de IL-6 e IL-17A.

Sorprendentemente, a pesar de que la población de células esplénicas productoras de IL-6 se encontraba disminuida en ausencia de linfocitos B (Figura 32), no se observaron diferencias significativas en la concentración de IL-6 sérica entre los grupos experimentales a los dos dpi estudiados (Figura 33). Incluso, se puede observar al día 20 pi, una tendencia a una concentración mayor de IL-6 sérica en los animales depletados (Figura 33). Por otra parte, la medición de IL-17A sérica no arrojó valores detectables en plasma con la técnica utilizada en ambos grupos experimentales.

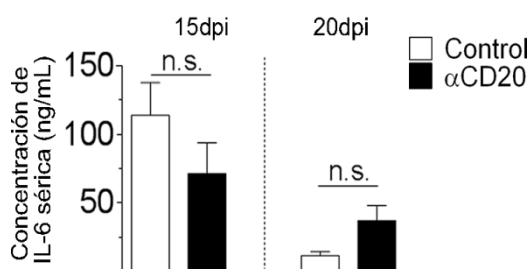


Figura 33: La depleción de linfocitos B no produce cambios en la concentración de IL-6 sérica. La sangre de ratones control (barras blancas) y depletados (barras negras) fue obtenida al día 15 y 20 pi (n=4 para cada grupo y dpi). Posteriormente se realizó la medición de IL-6 por ELISA en suero. Para evaluar la significancia de las diferencias se realizó un test T de student entre grupos a cada dpi. n.s.= no significativo.

Como describimos anteriormente, los linfocitos B productores de IL-17A poseen fenotipo de plasmoblastos [85]. Por lo tanto, con el objetivo de evidenciar si estas células se ubicaban espacialmente cerca de los linfocitos T dentro del bazo, se realizaron cortes histológicos del este órgano en los animales tratados con el anticuerpo control al día 0 y 15 pi. Posteriormente los mismos fueron incubados con los Acm anti-B220, anti-CD3 y anti-CD138 y posteriormente fueron visualizados en el microscopio de fluorescencia.

Como se puede observar en los dos paneles superiores de la Figura 34, el grupo control no infectado presenta las características de distribución celular correspondientes al estado normal del bazo. Por una parte, se encuentran los folículos de linfocitos B (rojo), y en la vecindad de estas regiones se distribuyen los linfocitos T (verde). Como era de esperar, la aparición de plasmoblastos (células CD138+, azul) es casi despreciable ya que se trata de un ratón no infectado. Además, cuando evaluamos las inmunofluorescencias de los ratones infectados con *T. cruzi* pudimos observar la presencia de los folículos de linfocitos B y la zona de linfocitos T (Figura 34, paneles centrales). De manera interesante, pudimos observar la presencia de una población de células CD138+ formando focos celulares extrafoliculares, lo cual coincide con los resultados previos de inmunohistoquímica publicados por nuestro grupo de trabajo [93]. Cabe destacar que estos plasmoblastos casi no expresan la molécula B220 (rojo), lo que se condice con los resultados de las Figuras 30 y 32 donde observamos que los linfocitos B productores de IL-17A tienen una baja expresión de los marcadores poblacionales como CD19, siendo esta una característica clásica de los plasmoblastos o células plasmáticas. Debido a que estos plasmoblastos secretan IL-17A, la ubicación anatómica de los mismos resulta fundamental para establecer qué células serían susceptibles a recibir las señales de esta citoquina. En relación a esto, pudimos observar a mayor aumento que los focos de plasmoblastos presentes en los ratones infectados se encontraron circundados e incluso infiltrados por linfocitos T (Figura 34, panel inferior, 40x). Este resultado refuerza la idea de que la IL-17A, y otros factores solubles, liberados por los plasmoblastos podrían afectar a la población de linfocitos T CD8+ durante el desarrollo de la respuesta antiparasitaria.

El tratamiento con IL-17A, pero no con IL-6, restaura la respuesta de los linfocitos T CD8+ en los animales depletados de linfocitos B

En base a los resultados que mostraban la disminución de las poblaciones esplénicas productoras de IL-6 e IL-17A en los animales carentes de linfocitos B (Figura 32) decidimos evaluar el impacto que podrían tener dichas citoquinas durante la generación de la respuesta de linfocitos T CD8+. En relación a esto, es necesario

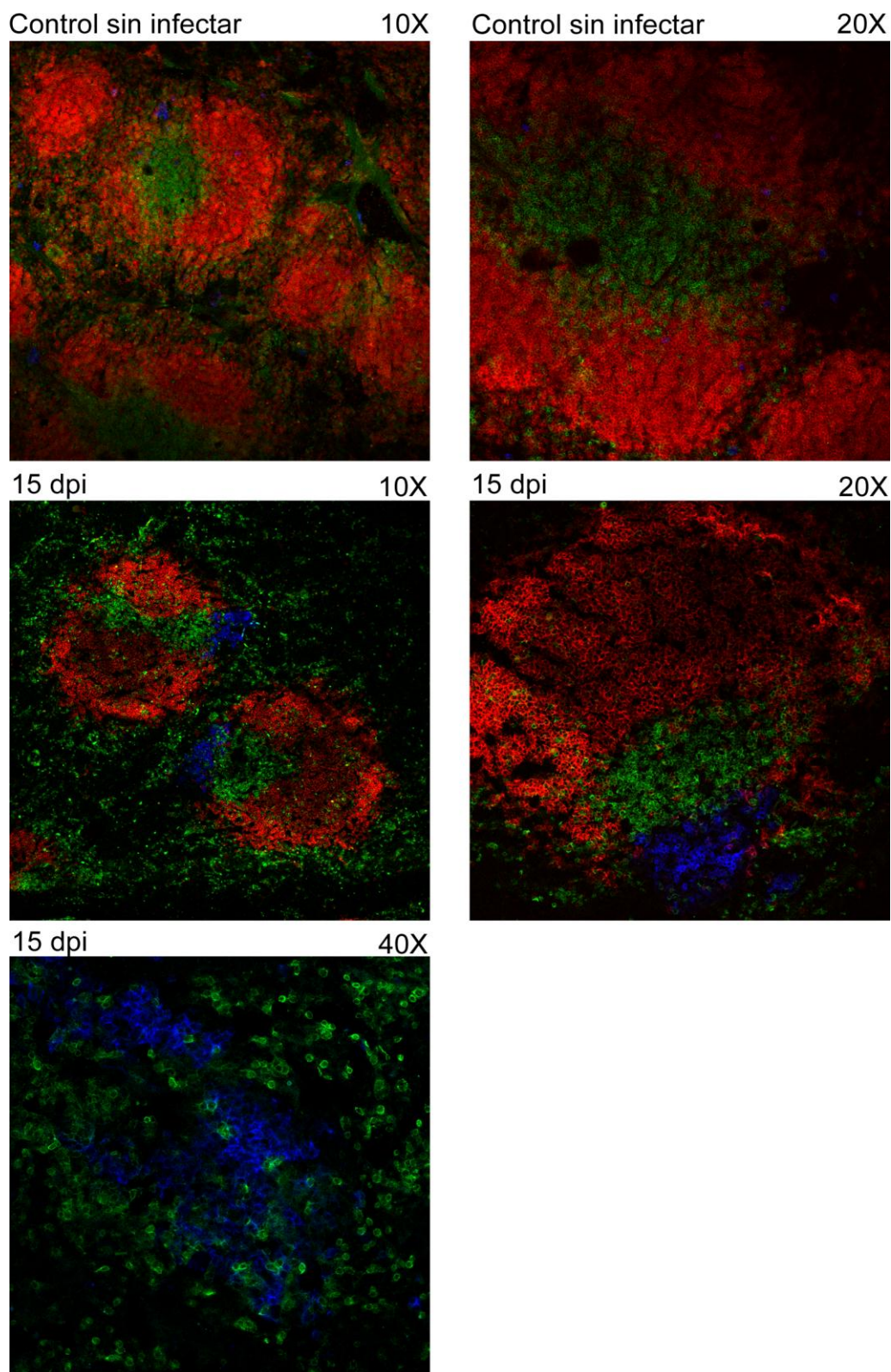


Figura 34: Los plasmoblastos generados durante la infección con *T. cruzi* se distribuyen en la zona de los linfocitos T. Imágenes representativas de cortes de bazo de ratones inyectados con anticuerpo control, no infectados (n=2) e infectados (15 dpi, n=3) que fueron incubados con los Acm anti-B220 marcado con ficoeritrina (PE del inglés *Phycoerythrin*, rojo), anti-CD3 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC del inglés *Fluorescein Isothiocyanate*, verde) y anti-CD138 marcado con alofocianina (APC del inglés *Allophycocyanin*, azul) y analizados en un microscopio de fluorescencia.

destacar los reportes que indican que la IL-6 puede afectar directa e indirectamente a la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ (revisado en [125]), y los resultados de tesis de doctorado de la Dra. Tosello Boari que demuestran como la ausencia del receptor A de la IL-17 (IL-17RA) afecta la respuesta citotóxica en la infección experimental con *T. cruzi* [157]. Por lo anteriormente dicho, decidimos tratar con citoquinas recombinantes al grupo de animales carentes de linfocitos B. Para ello, dosis sostenidas de IL-6 e IL-17A recombinantes fueron inyectadas según el esquema planteado en la Figura 35. Se eligió comenzar el tratamiento desde el día 12 pi, ya que este es el momento cuando se puede visualizar una frecuencia de linfocitos B productores de las citoquinas mencionadas (Figura 31). Seguidamente, los efectos que generaba el tratamiento con ambas citoquinas recombinantes sobre la respuesta inmune de los linfocitos T CD8⁺ fueron evaluados.

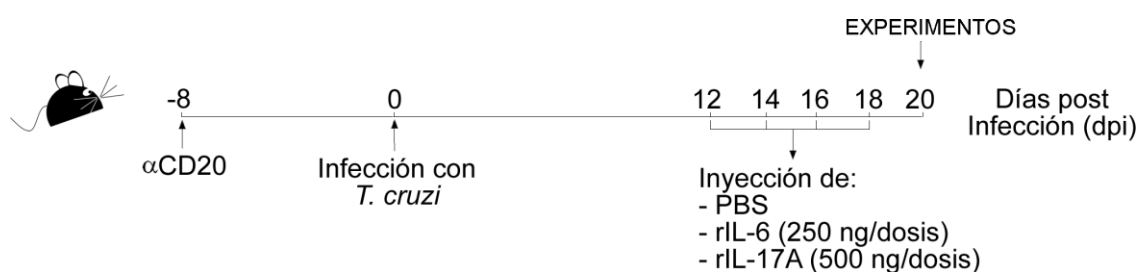


Figura 35: Esquema del tratamiento con IL-6 o IL-17A recombinantes de animales depletados de linfocitos B. Los animales que habían sido inyectados con α CD20 fueron infectados con *T. cruzi* y tratados a los 12, 14, 16 y 18 dpi con el vehículo (PBS), o con las citoquinas recombinantes IL-6 e IL-17A murinas mediante inyecciones intraperitoneales. Las determinaciones para evaluar la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ fueron realizadas a los 20 dpi.

En primer lugar, evaluamos la magnitud de la respuesta de linfocitos T CD8⁺ totales y específicos para *T. cruzi*. Para ello las células de bazo de animales inyectados con el anticuerpo control (Control), con α CD20 y aquellos administrados con α CD20 y tratados con rIL-6 (α CD20 + rIL-6) fueron obtenidas a los 20 dpi. Posteriormente, las células fueron incubadas con los Acm anti-CD8 y el tetrámero específico contra *T. cruzi*, marcados con diferentes fluorocromos y analizados por citometría de flujo.

Los ratones depletados y tratados con rIL-6 presentaron un porcentaje y número reducido de linfocitos T CD8⁺ totales y específicos en comparación con el grupo control infectado (Figura 36A y B). Por otra parte, no se encontraron diferencias entre los animales depletados tratados con rIL-6 o con PBS (Figura 36A y B).

Adicionalmente, evaluamos el fenotipo efector de los linfocitos T CD8⁺ esplénicos en los animales carentes de linfocitos B tratados con rIL-6 mediante el

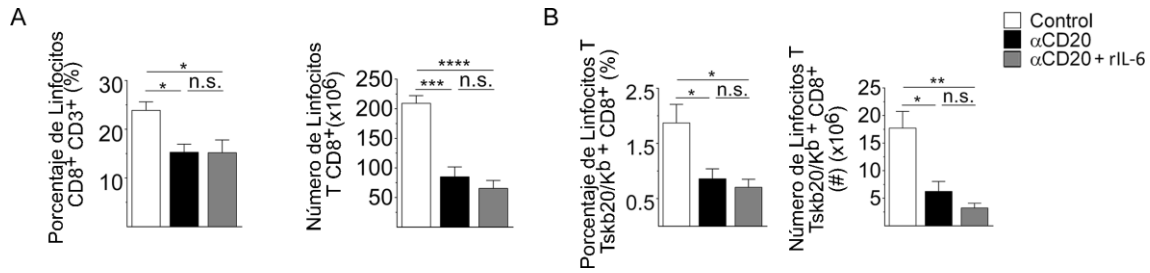


Figura 36: Los ratones depletados de linfocitos B tratados con rIL-6 exhibieron una respuesta reducida de linfocitos T CD8+ totales y específicos contra *T. cruzi*. Las células de bazo de ratones administrados con el anticuerpo control (Control) o con αCD20 tratados con PBS o con rIL-6, fueron obtenidas a los 20 dpi (n=5 por cada grupo). Posteriormente, las células fueron incubadas con el Acm anti-CD8 y el tetrámero, marcado con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A,B) Porcentaje y número de los linfocitos T CD8+ totales (A) y específicos (B), en los animales control (barras blancas) y depletados (barras negras) o depletados tratados con rIL-6 (barras grises). La significancia de las diferencias entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con * y ** (p≤0,05 y p≤0,01 respectivamente) (n.s.= no significativo).

análisis por citometría de flujo de las moléculas CD44, KLRG-1 e IL-7R, utilizadas para diferenciar las diferentes poblaciones celulares descritas en la Figura 13.

En la Figura 37 se puede observar que los linfocitos T CD8+ totales y específicos con características de SLEC generados en los animales depletados tratados con rIL-6 se encuentran significativamente disminuídos en comparación al grupo control (p<0,001 y p<0,01 respectivamente). Además, no se observaron diferencias en las poblaciones de linfocitos T CD8+ totales y específicos con fenotipo de SLEC entre los grupos depletados de linfocitos B, independientemente de si eran o no tratados con la rIL-6 (Figura 37).

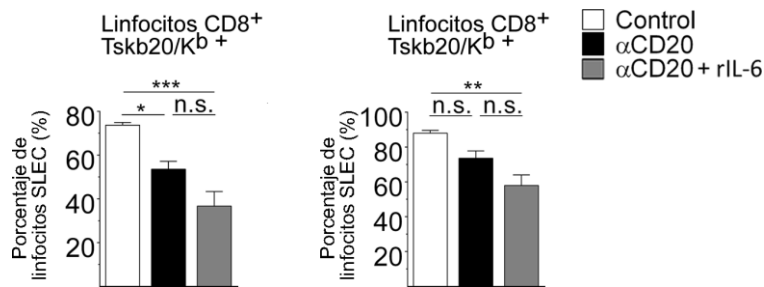


Figura 37: Los animales depletados tratados con rIL-6 presentan una reducción en el porcentaje de linfocitos T CD8+ con fenotipo de células efectoras. Las células de bazo de ratones administrados con el anticuerpo control (Control) o con αCD20 tratados con PBS o con rIL-6, fueron obtenidas a los 20 dpi (n=5 por cada grupo). Posteriormente, las células fueron incubadas con el tetrámero y los Acm anti-CD8, anti-CD44, anti-KLRG-1 y anti-IL-7Rα murinos, marcados con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. Porcentaje de las diferentes poblaciones efectoras en los linfocitos T CD8+ totales y específicos. La significancia de las diferencias entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con *, ** y *** (p≤0,05; p≤0,01 y p≤0,001 respectivamente) (n.s.= no significativo).

Seguidamente, la funcionalidad de los linfocitos T CD8⁺ de los animales depletados tratados con rIL-6 fue evaluada mediante el estudio de las células capaces de producir IFN γ . Para ello, células esplénicas fueron obtenidas de los ratones tratados con el anticuerpo control o con aquellos tratados con α CD20 administrados con PBS o rIL-6, al día 20 pi. Posteriormente las células fueron estimuladas de manera policlonal para el posterior análisis por citometría de flujo mediante la incubación con los Acm anti-CD8 y anti-IFN γ .

Se pudo observar que los linfocitos T CD8⁺ generados en ausencia de linfocitos B producen menores cantidades de IFN γ independientemente de haber sido tratados con dosis sostenidas de rIL-6 en comparación con su contraparte en el grupo control (Figura 38).

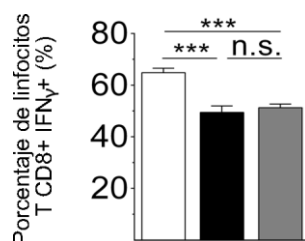


Figura 38: Los linfocitos T CD8⁺ presentaron una disminución en la producción de IFN γ en los animales inyectados con α CD20 tratados con rIL-6. Las células de bazo de ratones inyectados con el anticuerpo control o con α CD20 tratados con PBS o con rIL-6 fueron obtenidas al día 20 pi (n=5-6 por cada grupo). Dichas células fueron incubadas por 5 horas en presencia de monensina con PMA + Ionomicina. Posteriormente, las células fueron incubadas con los Acm anti-CD8 y anti-IFN γ marcados con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. Para realizar los análisis se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos T CD8⁺. La significancia de las diferencias entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con *** $p \leq 0,001$ (n.s.= no significativo).

Seguidamente, la población de linfocitos T CD8⁺ fue estudiada en el bazo de los animales depletados de linfocitos B e inyectados con PBS o con rIL-17A en comparación al grupo control (ratones infectados sin depleción de linfocitos B ni inyecciones de PBS o citoquinas). Para ello las células de bazo de animales inyectados con el anticuerpo control (Control), con α CD20 y aquellos administrados con α CD20 y tratados con rIL-17A (α CD20 + rIL-17A) fueron obtenidas a los 20 dpi. Posteriormente, las células fueron incubadas con los Acm anti-CD8 y el tetrámero específico contra *T. cruzi*, marcados con diferentes fluorocromos y analizados por citometría de flujo.

En la Figura 39A y B se puede observar que no existen diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ totales entre los grupos depletados inyectados con PBS y depletados tratados con rIL-17A. Sin embargo, un aumento significativo en el número de linfocitos T CD8⁺ totales se observó en los animales depletados tratados con rIL-17A, en comparación con el grupo de animales depletados inyectados con PBS

(Figura 39B). Se observó un aumento significativo en la frecuencia y número de linfocitos T CD8+ específicos para Tskb20 en los animales inyectados con α CD20 cuando fueron tratados con rIL-17A, en comparación a aquellos depletados y administrados con PBS (Figura 39C). La inyección de rIL-17A restauró los niveles de linfocitos T CD8+ específicos a los valores observados en el grupo infectado control (Figura 39C).

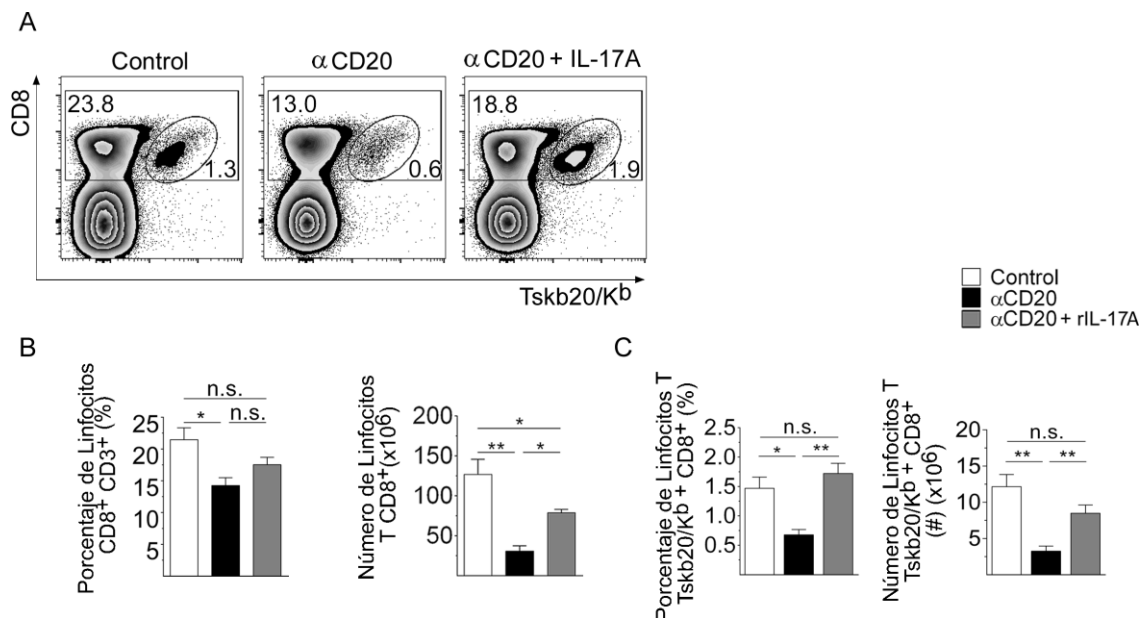


Figura 39: En los animales carentes de linfocitos B, el tratamiento con rIL-17A restauró el porcentaje y número de linfocitos T CD8+ totales y específicos. Las células de bazo de ratones administrados con el anticuerpo control (Control) o con α CD20 inyectados con PBS o rIL-17A e infectados fueron obtenidas a los 20 dpi (n=5-6 por cada grupo). Posteriormente, las células fueron incubadas con el Acm anti-CD8 y el tetrámero específico contra Tskb20, marcado con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A) Gráficos de dos parámetros representativos de la frecuencia de linfocitos T CD8+ y Tskb20/Kb+CD8+. La región marcada con un rectángulo y el número superior izquierdo corresponden a la población de linfocitos T CD8+ totales y su porcentaje respectivamente. B-C) Porcentaje y número de linfocitos T CD8+ (B) y Tskb20/Kb+CD8+ (C) esplénicos de los animales infectados no depletados (barras blancas), depletados de linfocitos B (barras negras), y depletados tratados con rIL-17A (barras grises). La significancia de las diferencias entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con * y ** ($p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$ respectivamente) (n.s.= no significativo).

Seguidamente, el perfil fenotípico de los linfocitos T CD8+ totales y específicos considerando la expresión de CD62-L, CD44, KLRG-1 e IL-7R α fue evaluado en los grupos de animales arriba mencionados. Para definir los diferentes fenotipos, la estrategia de regiones descritas en las Figuras 11A y 13A fue utilizada.

En el análisis se pudo observar que los linfocitos T CD8+ totales con fenotipo naïve disminuyó significativamente en los ratones carentes de linfocitos B tratados con rIL-17A en comparación al grupo sin linfocitos B inyectado con PBS (Figura 40A y B). Esta disminución podría ser a expensas del aumento del porcentaje (estadísticamente no significativo) de linfocitos T CD8+ totales con fenotipo Eff/Em (CD62L-CD44+) en los ratones inyectados con α CD20 y tratados con rIL-17A (Figura 40A y B). El porcentaje de

linfocitos T CD8+ específicos con fenotipo Eff/Em no se modificó considerablemente entre ambos grupos de animales depletados, aunque una tendencia al aumento de estas células fue observada cuando los animales depletados de linfocitos B fueron tratados con rIL-17A en comparación con aquellos inyectados con PBS (Figura 40B). Por otra parte, el porcentaje y número de linfocitos T CD8+ totales y específicos con fenotipo SLEC (CD44+KLRG-1+IL-7Rα-) se vio aumentado en los animales carentes de linfocitos B tratados con rIL-17A en comparación con los ratones depletados inyectados con PBS, alcanzando valores comparables a los que presentaba el grupo control (Figura 40C y D).

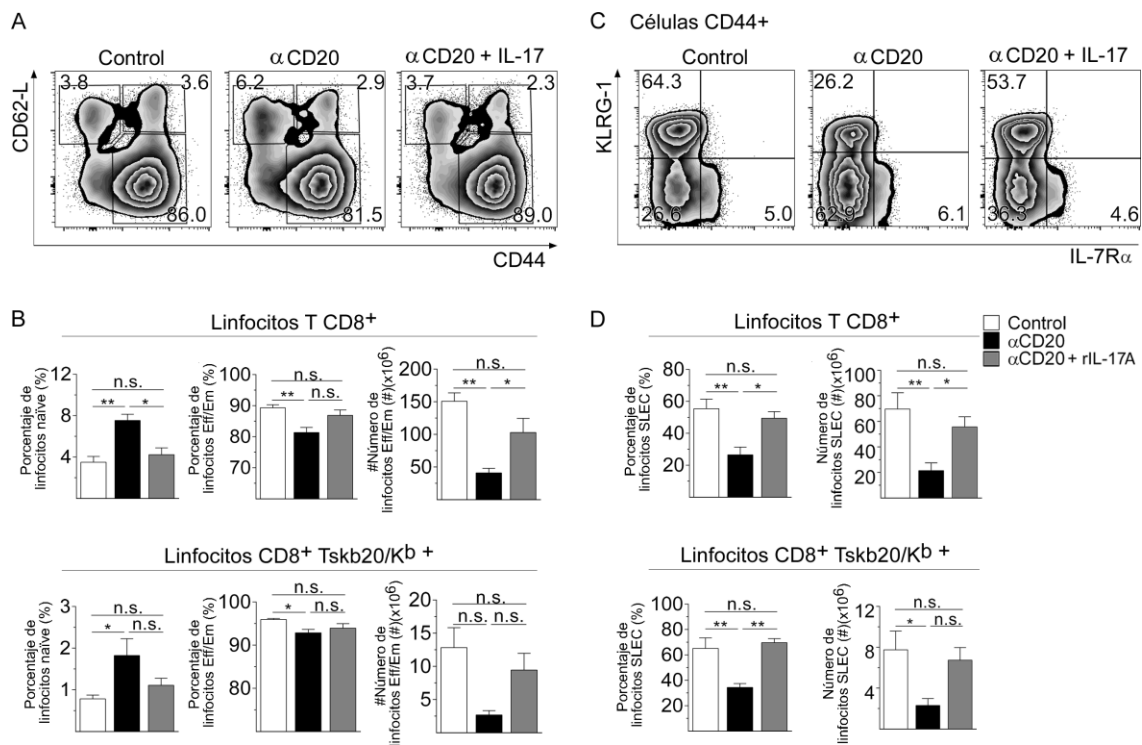


Figura 40: El tratamiento con rIL-17A restaura la frecuencia de células con fenotipo efector en los animales carentes de linfocitos B. Las células de bazo de ratones administrados con el anticuerpo control (Control) o con αCD20 inyectados con PBS o con rIL-17A e infectados fueron obtenidas a los 20 dpi (n=5-6 por cada grupo). Posteriormente, las células fueron incubadas con el tetrámero específico para *T. cruzi* y los Acm anti-CD8, anti-CD62-L, anti-CD44, anti-KLRG-1 y anti-IL-7Rα marcados con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. A,C) Gráficos de dos parámetros representativos de la frecuencia de los linfocitos T CD8+ totales en los diferentes estadios de diferenciación. Las regiones marcadas corresponden a las poblaciones equivalentes indicadas en la Figura 9A) y 10A) respectivamente y los números contiguos a su porcentaje. B,D) Porcentaje y número de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD8+ totales y específicos en los animales control (barras blancas), depletados de linfocitos B (barras negras), y depletados tratados con rIL-17A (barras grises). La significancia de las diferencias entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con * y ** (p≤0,05 y p≤0,01 respectivamente) (n.s.= no significativo).

Posteriormente, el efecto de IL-17A sobre la funcionalidad de los linfocitos T CD8+ en los animales carentes de linfocitos B fue analizado. Para ello, células

esplénicas de los tres grupos experimentales obtenidas al día 20 pi, fueron cultivadas según las siguientes condiciones: 1) medio de cultivo; 2) estímulo policlonal (PMA + Ionomicina) y 3) estímulo antígeno específico (péptido Tskb20), durante 5 horas en presencia de monensina. Luego del cultivo, las células fueron incubadas con los Acm anti-CD8 y anti-IFN γ murinos, marcados con diferentes fluorocromos y evaluadas por citometría de flujo.

Observamos que la frecuencia de linfocitos T CD8+ productores de IFN γ y TNF fue significativamente superior en los ratones depletados de linfocitos B tratados con rIL-17A en comparación con los ratones carentes de linfocitos B tratados con PBS (Figura 41A y B), cuando las células fueron incubadas con PMA + Ionomicina. Sin embargo, el porcentaje de linfocitos T CD8+ productores de IFN γ fue significativamente menor en los animales inyectados con α CD20 y tratados con rIL-17A en comparación al grupo control (Figura 41B). No se observaron diferencias en la capacidad de degranulación (CD107a+) que poseían los linfocitos T CD8+ de los diferentes grupos estudiados. De manera similar, el análisis de la estimulación con el antígeno específico mostró un aumento (aunque estadísticamente no fue significativo) en el porcentaje de linfocitos T CD8+ productores de IFN γ , TNF y CD107a+ en los ratones depletados tratados con rIL-17A en comparación a los animales depletados administrados con PBS (Figura 41C y D).

Para confirmar los resultados obtenidos acerca de la frecuencia de linfocitos productores de IFN γ , la expresión del factor de transcripción Tbet fue evaluada tanto en los linfocitos T CD8+ totales como específicos en los diferentes grupos de experimentación. Para ello, células esplénicas fueron obtenidas de animales control y de individuos depletados de linfocitos B administrados con PBS o con rIL-17A al día 20 pi. Las células obtenidas fueron incubadas con los Acm anti-CD8, anti-Tbet y el tetrámero específico contra Tskb20.

En la Figura 42 se puede observar que los linfocitos T CD8+ totales y específicos para *T. cruzi* presentan una IFM de Tbet significativamente mayor en los animales inyectados con α CD20 tratados con rIL-17A en comparación al grupo de animales depletados administrados con PBS (Figura 42B). Diferencias en la expresión de Tbet en los linfocitos T CD8+ entre el grupo control y los animales depletados tratados con rIL-17A no fueron observadas (Figura 42B).

Finalmente, nos propusimos evaluar el impacto del tratamiento con rIL-17A sobre el control de la replicación parasitaria estudiando el parasitismo tisular. Para ello, muestras de hígado, bazo y corazón fueron obtenidas de los animales control, animales depletados de linfocitos B administrados con PBS y de animales inyectados con α CD20 tratados con rIL-17A, y la cuantificación del ADN parasitario de las muestras obtenidas al día 20 pi fue realizada por PCR.

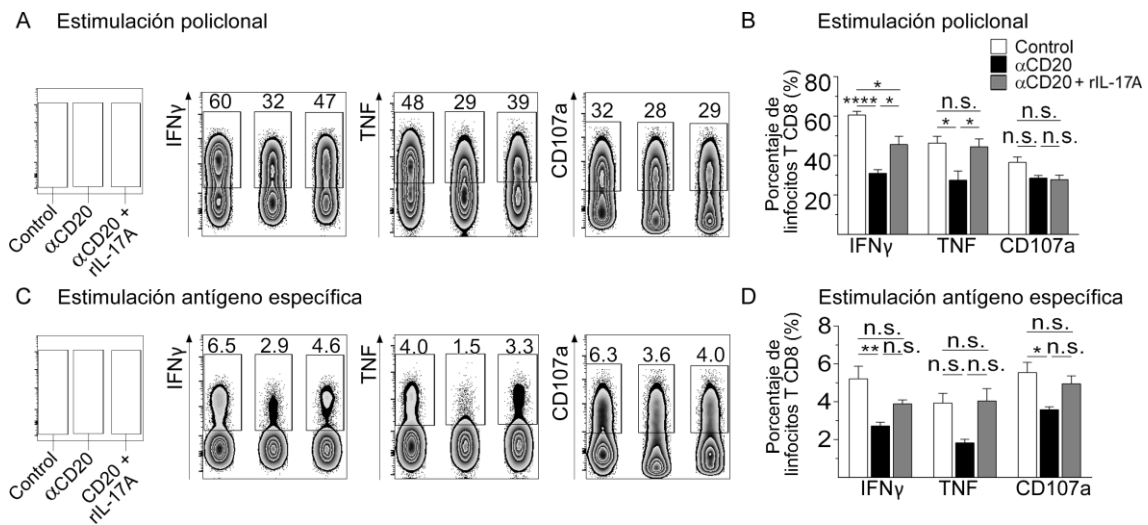


Figura 41: El tratamiento con rIL-17A genera un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8+ productores de IFN γ y TNF en los ratones carentes de linfocitos B. Las células de bazo de ratones inyectados con el anticuerpo control (barras blancas) o con α CD20 tratados con PBS (barras negras) o rIL-17A (barras grises) e infectados fueron obtenidas al día 20 pi (n=6 por cada grupo). Dichas células fueron incubadas por 5 horas en presencia de un anticuerpo anti-CD107a marcado con PE y monensina en: medio de cultivo (no estimuladas), o con el estímulo (A-B) policlonal (PMA + Ionomicina) o (C-D) péptido de *T. cruzi*. Posteriormente, las células fueron incubadas con los Acm anti-CD8, anti-IFN γ y anti-TNF murinos marcados con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. Para realizar los análisis se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos T CD8+. A los valores obtenidos para ambos estímulos, se les descontó el valor correspondiente al cultivo sin estímulo. A,C) Gráficos representativos de la frecuencia de linfocitos T CD8+ productores de IFN γ , TNF o que degranulan (CD107+). La región marcada, del grupo control o inyectados con α CD20 y PBS o α CD20 y rIL-17A, y el número contiguo corresponden a la población positiva y su porcentaje respectivamente. B,D) Estadística del análisis de A y C respectivamente. La significancia de las diferencias entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas se indican con *, ** y **** (p<0,05, p<0,01 y p<0,001 respectivamente) (n.s.= no significativo).

Los animales carentes de linfocitos B tratados con rIL-17A presentaron un parasitismo tisular significativamente menor en todos los órganos estudiados comparado con los niveles observados en los animales depletados administrados con PBS (Figura 43). Llamativamente, los niveles de parasitismo tisular esplénico y cardíaco de los animales carentes de linfocitos B y tratados con rIL-17A fueron aun menores a los observados en los ratones control (p<0,0001, Figura 43).

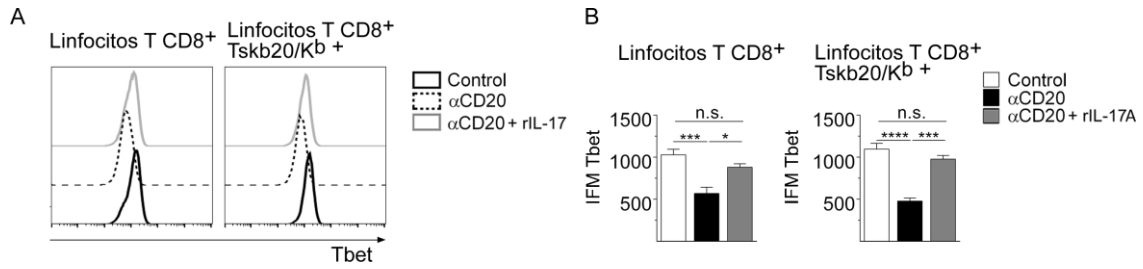


Figura 42: Los linfocitos T CD8+ presentes en animales depletados de linfocitos B tratados con rIL-17A presentaron un aumento en la expresión de Tbet. Las células de bazo de ratones administrados con el anticuerpo control (Control) o con αCD20 inyectados con PBS o con rIL-17A e infectados fueron obtenidas a los 20 dpi (n=5-6 por cada grupo). Posteriormente, las células fueron incubadas con el Acm anti-CD8, el tetrámero específico contra Tskb20 y el Acm anti-Tbet marcado con diferentes fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. Para realizar los análisis se seleccionó la región correspondiente a los linfocitos T CD8+ o CD8+Tskb20/Kb+. A) Histogramas representativos de la expresión de Tbet en los linfocitos T CD8 totales y específicos. La línea negra continua corresponde a la expresión en el animal control, la línea negra discontinua corresponde a la expresión en el grupo inyectado con αCD20 administrado con PBS y la línea gris continua corresponde a la expresión en el grupo inyectado con αCD20 tratado con rIL-17A. B) Gráficos de la intensidad de fluorescencia media (IFM) de la expresión los marcadores medidos en A) en el grupo control infectado (barras blancas) y depletados infectados administrados con PBA (barras negras) y depletados infectados tratados con rIL-17A (barras grises). La significancia de las diferencias de cada población entre grupos fue estudiada realizando un análisis estadístico de Anova de dos vías seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con *, ** y **** (p<0,05, p<0,001 y p<0,0001 respectivamente) (n.s.= no significativo).

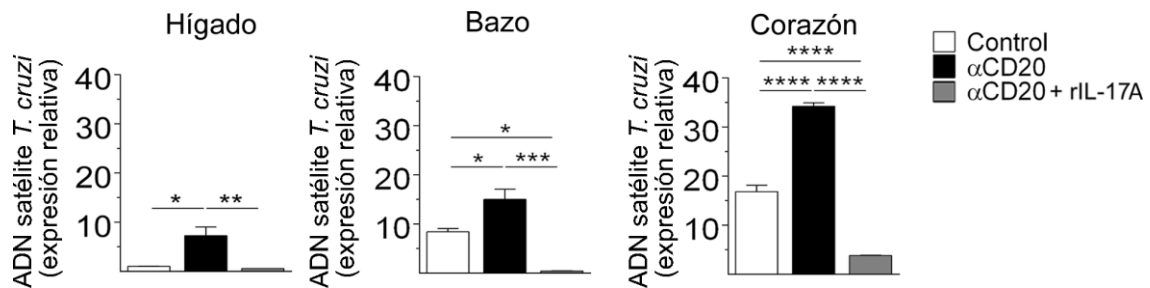


Figura 43: Los ratones carentes de linfocitos B tratados con rIL-17A presentaron un menor parasitismo tisular. Carga parasitaria en hígado, bazo y corazón determinadas en el grupo de animales control (barras blancas), depletados de linfocitos B administrados con PBS (barras negras) o depletados de linfocitos B tratados con rIL-17A e infectados obtenidos a los 20 dpi (n=4 para cada grupo). La cuantificación del ADN parasitario fue normalizada a la GAPDH murina, y se asignó el valor de 1 a la expresión relativa de ADN satélite al hígado del animal control infectado. Los valores estadísticos fueron calculados realizando un ANOVA de dos vías, seguido por el post-test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias significativas entre los grupos control y αCD20 se indican con *, **, *** y **** (p<0,05, p<0,01, p<0,001 y p<0,0001 respectivamente).

CONCLUSIONES III

La disminución del porcentaje y número de linfocitos T CD8+ específicos para *T. cruzi*, así como los cambios en la frecuencia de células con fenotipo naïve, efector y de memoria, y la disminución de la funcionalidad observados en los animales carentes de linfocitos B no son consecuencia de una deficiente/ausente presentación antigénica por parte de estas células.

Durante la infección con *T. cruzi* los linfocitos B son la principal fuente de células productoras de IL-6 e IL-17A.

La inyección con α CD20 provoca la desaparición de los linfocitos B productores de IL-6 e IL-17A, entre otras poblaciones celulares; aunque en ausencia de estas células no se observan diferencias en la concentración sérica de IL-6, sugiriendo que IL-6 es aportada por otros tipos celulares.

El tratamiento con rIL-6 en los animales carentes de linfocitos B no produce cambios en la magnitud de la respuesta de linfocitos T CD8+, tampoco en las frecuencias de las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ o en la funcionalidad de estas células.

El tratamiento con rIL-17A en animales depletados de linfocitos B restaura el porcentaje y número de linfocitos T CD8+ totales y específicos para *T. cruzi*. El tratamiento incrementa la frecuencia de células con fenotipo efector y la funcionalidad de los linfocitos T CD8+.

Los animales carentes de linfocitos B tratados con rIL-17A presentan una reducida replicación parasitaria en comparación con los animales depletados y sin tratar con IL-17.

DISCUSIÓN

Hace más de 50 años se publicaban los primeros descubrimientos en aves que demostraban la presencia de un subtipo de células, provenientes de un órgano denominado bolsa de Fabricio, las cuales eran independientes de los linfocitos obtenidos del timo de dichos animales, denominando a estas células como linfocitos B por la fuente de este subtipo celular [158]. Desde entonces y hasta el momento, numerosos avances en el campo de la inmunobiología de estas células han sido realizados. A pesar de que los linfocitos B son conocidos gracias a su irremplazable habilidad en fabricar inmunoglobulinas, las cuales son expresadas en su membrana celular o secretadas de manera soluble, otras funciones independientes de la producción de anticuerpos han sido descritas. Entre estas funciones, la capacidad de secretar citoquinas, las cuales modulan las respuestas de otras poblaciones celulares, componen un interés activo en la investigación [3, 13, 14, 23, 50].

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se estudió el rol que poseen los linfocitos B sobre la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ en el modelo de la infección experimental con *T. cruzi*. Para ello, los linfocitos B fueron eliminados mediante la inyección de un anticuerpo monoclonal contra la molécula CD20, expresada en los linfocitos B maduros, como se había utilizado en otros trabajos [159, 160] y la respuesta de linfocitos T CD8⁺ fue evaluada. Se pudo observar que la depleción de linfocitos B inducida por una sola inyección del anticuerpo monoclonal permitía realizar estudios hasta 28 días posteriores a la misma, sin observar el resurgimiento de estas células cuando los animales estaban infectados con *T. cruzi*, aunque no en ausencia de la infección. La diferencia de efectividad de la depleción puede deberse a la intensa apoptosis que sufren los linfocitos B durante la infección experimental con *T. cruzi*, reportado previamente por nuestro grupo de trabajo [161]. A nivel de la médula ósea (órgano que le da origen a los linfocitos B), existe una fuerte reducción del número de linfocitos B inmaduros, que termina por comprometer a la población capaz de alcanzar la periferia [162]. En cuanto a la respuesta que ocurre en órganos linfáticos secundarios se ha observado que los linfocitos B de bazo de los animales infectados sufren mayor apoptosis *in vivo* e *in vitro* que su contraparte en el ratón normal, mediante un mecanismo dependiente de la señalización entre Fas y FasL [163].

Los linfocitos B actúan como células inductoras del tejido (revisado por S. Fillatreau y colaboradores en [23]) y en tal sentido, se ha descrito que la ausencia congénita de linfocitos B conlleva a una disminución en la secreción de CCL21 en el bazo, y en consecuencia se observa un menor número de linfocitos T en dicho órgano [27]. No obstante, se ha visto que este efecto sobre los linfocitos T opera solamente durante los estadios iniciales de la organogénesis del bazo [27]. En relación a esto, debido a que la estrategia de depleción elegida para realizar este proyecto de tesis involucró la eliminación de estas células en la etapa adulta del animal, donde todas las estructuras normales de los órganos linfáticos secundarios ya se generaron, logramos

evitar la adición de una variable (la estructura y el número de linfocitos T) que podría afectar la interpretación de los resultados observados. En efecto, los animales depletados de linfocitos B sin infectar presentaron distribuciones similares de linfocitos T que los ratones controles, denotado por los estudios de inmunofluorescencia, y no se observaron diferencias en la cantidad de linfocitos T CD8+ totales entre ambos grupos experimentales cuando estos se encontraban libres de infección.

Una vez establecido el esquema de depleción e infección con *T. cruzi*, nos enfocamos en la evaluación de la capacidad que tenían estos ratones en controlar la replicación parasitaria, tanto de la forma de tripomastigote circulante como de amastigote en los diferentes tejidos infectados. En relación a la primera medición (cuantificación de la parasitemia), no hemos observado diferencias entre ambos grupos experimentales hasta el último día estudiado (día 20 pi). Estos resultados se correlacionan con estudios publicados previamente por el grupo del Dr. Tarleton [164], donde se observó que ratones μ MT (deficientes en linfocitos B) presentaban valores de parasitemia similares a los ratones controles infectados con *T. cruzi* hasta el día 28 pi, aunque posteriormente los niveles de parasitemia se disparaban en los ratones carentes de linfocitos B, lo que conducía a su menor sobrevivencia. En relación a esto se supone que, si bien los anticuerpos colaboran en el control de la parasitemia, no cumplirían un rol fundamental durante la etapa aguda de la infección. Esto podría deberse en parte a la activación policlonal que sufren los linfocitos B durante el período agudo de esta infección (revisado en [165]), la cual retrasa la aparición y/o diluye la respuesta humoral específica. A causa de esto, reportes de nuestro laboratorio y otros han evidenciado que la respuesta de anticuerpos específicos contra el parásito comienza a ser detectable recién al día 18 post infección ([93, 166]. De lo anteriormente expuesto y considerando que todos los experimentos realizados en esta tesis se llevaron a cabo durante la etapa aguda de la infección, podemos postular que los efectos que los linfocitos B ejercen sobre la población de linfocitos T CD8+ estarían mínimamente influenciados por los anticuerpos específicos contra *T. cruzi*.

A pesar de que no se observaron diferencias en la parasitemia, la cuantificación del ADN parasitario reflejó una clara disminución en la capacidad de controlar la replicación del *T. cruzi*, en aquellos animales carentes de linfocitos B, en coincidencia con otro reporte que demostraba un aumento en el parasitismo tisular en animales μ MT en comparación al grupo control infectado [99]. Queda pendiente la evaluación del impacto que tendría el aumento en el parasitismo tisular en el estadio crónico de la infección experimental. No obstante, podríamos adelantarnos con la hipótesis de que los ratones carentes de linfocitos B podrían tener mayor daño tisular en la etapa crónica, debido a que complicaciones como la cardiomiopatía chagásica se asocian con la persistencia del *T. cruzi* en los órganos blanco de la infección, la cual resulta en una reacción inflamatoria crónica [167, 168].

Considerando que la respuesta de linfocitos T CD8+ es crítica en el control de la infección con *T. cruzi*, pudimos evidenciar un pico en la respuesta total y específica contra el péptido inmunodominante Tskb20 de los linfocitos T CD8+ hacia el día 20 pi, en los animales controles infectados, en coincidencia con los trabajos ya publicados por el laboratorio del Dr. Tarleton [133, 142]. En cambio, la ausencia de linfocitos B condujo a una contracción temprana de la respuesta arriba mencionada, que provocó una reducción de los linfocitos T CD8+ totales y específicos al día 20pi. Estos hallazgos podrían explicar las diferencias encontradas en el parasitismo tisular en ambos grupos de experimentación. En relación a esto, se ha descrito la presencia de un mayor número de parásitos en el tejido de ratones β 2microglobulina KO (no poseen linfocitos T CD8+) en comparación con ratones control infectados [127], aunque en otra publicación se demostró que ratones carentes de linfocitos T CD8+ Tskb20+ (disminución inducida mediante la tolerización hacia dicho antígeno) presentaban solamente una tendencia al aumento del parasitismo muscular [142]. Esta discrepancia puede deberse a tres factores principales: 1) la diferencia del número inicial de parásitos utilizados para realizar la infección (ya que en dicho trabajo utilizaron 1000 tripomastigotes mientras que en el presente trabajo de tesis se utilizaron 5000), el cual indefectiblemente impactará en la carga parasitaria; 2) la cepa de parásitos utilizada; se utilizó la cepa *Brazil*, mientras que en el presente trabajo de tesis se utilizó la cepa *Tulahuén*; y 3) la respuesta específica está mayoritariamente dirigida hacia el péptido Tskb20, sin embargo linfocitos T CD8+ específicos para otros epítopes también pueden estar afectados por la ausencia de linfocitos B y, por lo tanto, aportar a la disminuida capacidad de controlar el parásito a nivel intracelular. En el trabajo mencionado solamente se encuentra afectada la población específica contra Tskb20, que se eliminó por tolerización específica.

En relación a la cinética de la respuesta de linfocitos T CD8+, se ha descrito que durante la infección con *L. monocitogenes*, la contracción de la respuesta de linfocitos T CD8+ específicos depende fuertemente del contexto inflamatorio, en especial de la cantidad de IFN γ secretado por diferentes células [169]. En el caso de la infección con *T. cruzi*, la contracción temprana de la respuesta de linfocitos T CD8+ específica observada en los ratones carentes de linfocitos B no estaría gobernada por IFN γ , ya que resultados previos mostraron que en ratones μ MT infectados hay una reducida cantidad de IFN γ sérico [99] o de linfocitos T CD4+ productores de IFN γ [100], en comparación con el grupo control infectado. Adicionalmente, en esta tesis doctoral hemos reportado que linfocitos T CD8+ productores de IFN γ están significativamente disminuidos cuando los animales infectados son previamente tratados con α CD20. En cambio, la disminución en la tasa de proliferación y el aumento de células con características de apoptosis celular observados en los linfocitos T CD8+ totales y específicos provenientes de los ratones carentes de linfocitos B explicarían la

contracción temprana observada. La diferencia en la proliferación de los linfocitos T CD8+ entre los ratones infectados, con y sin linfocitos B, está asociada con la magnitud de las diferencias encontradas en la frecuencia de linfocitos T CD8+ totales y específicos.

A pesar de que en las infecciones virales crónicas se ha visto que la respuesta de linfocitos T CD8+ predominante es la de células efectoras (esto es debido a la presencia permanente del antígeno), se ha reportado que en la infección experimental con *T. cruzi*, luego de un año de infección, un considerable porcentaje de las células CD8+ específicas mantienen un fenotipo de células de memoria central. Estas células son capaces de mantenerse homeostáticamente en ausencia del antígeno debido a que expresan el receptor de la IL-7 (CD127). Esta citoquina les brinda la señal de sobrevivencia necesaria; y pueden reconvertirse a células efectoras ante el reingreso del patógeno [170]. En relación a esto, en los resultados de esta tesis pudimos evidenciar una disminución del número de linfocitos T CD8+ totales y específicos con fenotipo de células de memoria en aquellos animales carentes de linfocitos B. Resulta importante destacar que la masiva proliferación de los clones de linfocitos T CD8+ específicos que ocurre en los animales control, pero no en los depletados de linfocitos B, es crítica para la generación de la inmunidad a largo plazo ya que determina el número final de los linfocitos T de memoria que se generan [171, 172]. Este hallazgo debe ser tomado en cuenta al momento del diseño de vacunas efectivas contra esta infección y contra otros patógenos intracelulares, ya que el objetivo que mayormente se desea alcanzar con las inmunizaciones es el de generar una robusta respuesta de memoria capaz de perdurar en el tiempo.

Adicionalmente, hemos evidenciado una marcada disminución tanto en el porcentaje como en el número de linfocitos T CD8+ totales y específicos para *T. cruzi* con fenotipo de células efectoras en los animales deficientes en linfocitos B. En relación a esto hemos observado un menor porcentaje y número de linfocitos T CD8+ que expresaban la molécula KLRG-1, la cual caracteriza a la población de linfocitos T CD8+ efectoras de corta vida. Debido a que se ha reportado el requerimiento de una intensa proliferación para que un linfocito T CD8+ logre expresar la molécula KLRG-1 [173], este resultado estaría fuertemente relacionado con la disminuida expresión del marcador de proliferación Ki67 en los linfocitos T CD8+ de los animales depletados. Por otra parte, se ha reportado que el microambiente inflamatorio generado por una infección aguda o por inmunización con el adyuvante CpG, y no la cantidad de antígeno disponible, favorece la generación de linfocitos T CD8+ KLRG-1+ terminalmente diferenciados, posiblemente vía la citoquina pro inflamatoria IL-12, la cual tiene la capacidad de inducir la expresión del factor de transcripción Tbet [151]. De acuerdo con esta información, pudimos evidenciar que el menor porcentaje de linfocitos T CD8+ KLRG-1+ se asoció con una disminución en la expresión de Tbet en estas células.

Por otro lado, hemos detectado que los linfocitos B pueden producir IL-12 durante la infección con *T. cruzi* (datos no mostrados), por lo que especulamos que las células B productoras de IL-12 podrían estar favoreciendo la generación de los linfocitos T CD8+KLRG1+Tbet+. Además, los animales carentes de linfocitos B presentan mayores niveles de parasitismo tisular, y por lo tanto sería difícil pensar que la inflamación está influenciando a la población ya que en éste escenario la inflamación es alta y la población de linfocitos T CD8+ KLRG-1+ está disminuida.

A pesar de que muchos estudios han reportado que durante las infecciones crónicas los linfocitos T CD8+ pueden presentar un estado de agotamiento [115], se postula que en la infección con *T. cruzi* esto no ocurriría en gran medida [123]. En nuestro trabajo, durante la evaluación del fenotipo que presentaban los linfocitos T CD8+ no se observaron signos de agotamiento celular (denotados en parte por la expresión de receptores inhibitorios) cuando el análisis provenía de animales controles infectados. No obstante, observamos un aumento significativo de algunos receptores inhibitorios en los linfocitos T CD8+ totales y específicos provenientes de los animales depletados de linfocitos B. Este último resultado se condice con aquellos estudios que demuestran cierto grado de agotamiento celular en los linfocitos T CD8+ cuando los animales son infectados con una alta dosis de parásitos [137, 138], teniendo en cuenta que en los animales depletados existe una menor capacidad de controlar el parásito a nivel de tejido. En tal sentido, se ha demostrado que durante la infección experimental con la cepa crónica del LCMV [116], en modelos murinos infectados con el virus de la influenza [117] o en humanos infectados con HIV [118, 119], la estimulación antigénica persistente conlleva al agotamiento celular y en casos extremos a la depleción final de los linfocitos T específicos de antígeno.

En cuanto a la funcionalidad de los linfocitos T CD8+ totales generados en ausencia de linfocitos B, pudimos observar una marcada disminución de células capaces de secretar IFN γ y TNF, siendo IFN γ una citoquina clave en el control de esta infección parasitaria [106, 174]. Este resultado fue respaldado por la expresión del factor de transcripción Tbet, el cual conduce la expresión de IFN γ , cuya expresión se encontraba significativamente disminuida en los linfocitos T CD8+ totales de los animales carentes de linfocitos B. Por otra parte, en la evaluación de la funcionalidad de los linfocitos T CD8+ específicos para *T. cruzi* generados en los animales carentes de linfocitos B, pudimos observar una disminución de la producción de IFN γ , TNF y de la capacidad de degranular. No obstante, en este caso puede que las diferencias observadas sean debidas a la disminución del porcentaje de células específicas capaces de responder al péptido utilizado para estimularlas y no a una menor funcionalidad de la célula *per se*. De igual manera, la marcada disminución en la expresión de Tbet observada en los linfocitos T CD8+ específicos de los animales inyectados con α CD20 nos permite especular que al menos la producción de IFN γ por parte de estas células

podría estar afectada. De manera interesante, se observó una disminución significativa de la polifuncionalidad en los linfocitos T CD8+ provenientes de los animales carentes de linfocitos B. Este hallazgo guarda una estrecha relación con el fenómeno de agotamiento celular arriba mencionado, ya que se ha descrito que los linfocitos T CD8+ que ingresan en esta fase de disfunción celular comienzan a perder paulatinamente sus funciones efectoras [115], y se corresponde con los hallazgos observados en los pacientes con Chagas crónico, en los cuales se observó que los linfocitos T comenzaban a perder sus características polifuncionales [141]. Por otra parte, la reducida polifuncionalidad puede tener un mayor impacto en el control de la carga parasitaria. En relación a esto, se ha reportado que pacientes con HIV con patología progresiva poseen una reducida polifuncionalidad de sus linfocitos T CD8+ cuando son comparados con pacientes infectados en los cuales la patología se mantiene estable (sin progresión) [113].

En adición a los estudios de funcionalidad *in vitro*, en esta tesis realizamos un estudio de citotoxicidad *in vivo* para determinar la eficiencia de la respuesta de los linfocitos T CD8+ generados. Resulta interesante destacar que el ensayo puesto en marcha -en el cual se combinó la transferencia simultánea de la mezcla de 4 poblaciones celulares cargadas con 3 péptidos diferentes o sin cargar (población control), y teñidas con una combinación de dos colorantes intravitales distintos de manera de poder distinguir a cada una de ellas mediante citometría de flujo-, no fue descrito previamente en ningún trabajo publicado al momento y, por lo tanto, constituye un avance metodológico original en el campo del estudio de los linfocitos T CD8+. El mismo posee la ventaja de poder realizar el estudio de la citotoxicidad *in vivo* para múltiples péptidos al mismo tiempo, disminuyendo la cantidad de veces necesarias para hacer el ensayo en caso de requerirlo, ya que las metodologías estándares de bibliografía contemplan solamente la evaluación de la citotoxicidad para uno [175] o dos péptidos [133] mediante la utilización de un único colorante. Mediante este ensayo pudimos determinar una menor actividad citotóxica contra el péptido inmunodominante Tskb20. Fue interesante observar, en este mismo grupo de animales se pudo observar una disminución en el potencial citotóxico hacia la población cargada con el péptido Tskb18, la cual genera una respuesta de linfocitos T CD8+ específica de menor magnitud, de manera que no pudo ser detectada por citometría de flujo mediante la utilización de un tetrámero. Cabe destacar que estos resultados son reflejo del menor porcentaje de linfocitos T CD8+ específicos presentes en los animales depletados de linfocitos B, en sumatoria a la disminuida funcionalidad descrita en los ensayos de producción de citoquinas y degranulación. Por otra parte, la disminución en la citotoxicidad hacia el péptido Tskb18 sugiere que la respuesta de linfocitos T CD8+ se encontraría afectada en su totalidad y no solamente en la respuesta hacia el péptido inmunodominante.

El conjunto de defectos observados en los linfocitos T CD8⁺ de los animales carentes de linfocitos B sugieren que estos últimos podrían estar colaborando con la respuesta de linfocitos T mediante alguna de sus múltiples funciones descriptas. Por ello en primer lugar, evaluamos el aporte de la presentación antigénica por parte de los linfocitos B en el desarrollo de la respuesta de linfocitos T CD8⁺ específicos. Para ello, los linfocitos B fueron depletados a tiempos avanzados de la infección, donde la respuesta específica ya se encontraba desarrollada casi en su totalidad (12 dpi). De manera interesante, no encontramos diferencias en el desarrollo de la respuesta de linfocitos T CD8⁺ específicos entre el grupo de animales en los cuales la depleción había sido realizada en momentos previos a la infección y aquellos que fueron depletados al día 12 pi. Estos resultados nos permiten postular que la presentación antigénica no sería el mecanismo mediante el cual los linfocitos B podrían estar influenciando a la respuesta de linfocitos T CD8⁺. No obstante, en el esquema experimental planteado no eliminamos la posibilidad de que exista una presentación antigénica tardía responsable de expandir la respuesta de los linfocitos T CD8⁺. Por lo tanto, un esquema experimental como el cultivo *in vitro* de linfocitos T CD8⁺ respondedores junto con linfocitos B de ratones infectados WT o β_2m KO- que no poseen MHC I, por lo cual no pueden presentar antígenos a los linfocitos T CD8⁺ (realizado en [176]) sería necesario para arribar a una conclusión más certera.

Seguidamente, nos enfocamos en la evaluación de las diferentes citoquinas secretadas por los linfocitos B con capacidad de modular la respuesta de los linfocitos T CD8⁺. En relación a esto, se ha visto que durante las infecciones virales los linfocitos T CD8⁺ reciben diferentes señales de advertencia dadas por el microambiente, como los interferones de tipo 1 (IFN I) e IL-6 entre otras, aumentando su capacidad efectora [125]. No obstante, a pesar de que durante la infección con *T. cruzi* se observa un incremento de los IFN I y de diferentes genes respondedores a los IFN I, se ha descrito que ratones carentes del receptor de los IFN I (IFNAR KO) no poseen una respuesta alterada de linfocitos T CD8⁺ totales ni específicos contra Tskb20+ [177]. Por otro lado, se ha descrito que la IL-6 es importante para el control de dicha infección, a pesar de que no se estudió puntualmente si el efecto era directo sobre los linfocitos T CD8⁺ o sobre otra población celular [178]. Además, se ha reportado que la estimulación *in vitro* con IL-6 frena la nitración de los linfocitos T CD8⁺ en células mononucleares obtenidas de pacientes sanos, aumentando su sobrevivencia [179]. Adicionalmente, el trabajo de beca doctoral de la Dra. Jimena Tosello [157] demostró que la señalización por el receptor de la citoquina IL-17 es capaz de promover la respuesta de linfocitos T CD8⁺ en la infección experimental con *T. cruzi*. En dicho trabajo observaron que ratones deficientes para la subunidad A del receptor de la IL-17 (IL-17RA KO) presentaban una contracción temprana de la respuesta de linfocitos T CD8⁺ específica en conjunto con una disminuida funcionalidad y un aumento de la expresión de diferentes receptores inhibitorios [157], resultados que se condecían con los hallazgos

observados en los ratones depletados de linfocitos B. Dado que en nuestro grupo de trabajo habíamos reportado que los linfocitos B producen IL-17A durante la infección con *T. cruzi* [85], decidimos estudiar cómo se encontraban las poblaciones celulares productoras de esta citoquina, y aquellas productoras de IL-6, en los animales control y en los depletados de linfocitos B. Allí pudimos evidenciar que los linfocitos B son capaces de producir IL-6 e IL-17A pero no IL-10, IFN γ o TNF durante la infección, y que las poblaciones de linfocitos B IL-6+ o IL-17A+ presentaron una cinética similar a la que presentaba la parasitemia. Mientras que la producción de IL-17A por parte de los linfocitos B IL-17A+ se debe a que la TS parasitaria gatilla la producción de dicha citoquina de manera directa [85], la producción de IL-6 por parte de los linfocitos B podría ser producto de la señalización del parásito sobre algún receptor de la inmunidad innata presente en estas células, como se reportó anteriormente frente al estímulo con LPS [39]. Como era de esperar, en los animales inyectados con α CD20, se observó una ausencia de linfocitos B productores de IL-17A y de aquellas células no B productoras de dicha citoquina. Adicionalmente, las mediciones de dicha citoquina en suero de los animales infectados reflejó valores por debajo del límite de detección de la técnica, incluso cuando este ensayo fue realizado en aquellos ratones que habían sido consecutivamente tratados con IL-17A murina recombinante (dato no mostrado), sugiriendo que esta citoquina se encuentra en muy bajas cantidades en circulación. Por otra parte, si bien se observó una disminución de las células productoras de IL-6 en los animales depletados de linfocitos B, la cuantificación de dicha citoquina en suero no reflejó diferencias significativas entre ambos grupos experimentales. Esto nos permite postular que otras poblaciones celulares diferentes de los linfocitos B serían las encargadas de sostener los niveles de IL-6 séricos durante esta infección. En relación a esto la IL-6 podría ser producida por monocitos, linfocitos T e incluso por células que no provienen del linaje hematopoyético como las células endoteliales.

Los resultados sobre la disminución de las células productoras de IL-17A en los animales depletados nos permitían hipotetizar de que esta citoquina, secretada por los linfocitos B, podría estar afectando a la población de linfocitos T CD8+. Por lo tanto, el acercamiento espacial de ambas poblaciones proporcionaría una ventaja óptima necesaria para que los linfocitos T CD8+ reciban estas señales solubles por parte de los linfocitos B. Dado que los linfocitos B productores de IL-17A poseen en su gran mayoría un fenotipo de plasmoblastos o células plasmáticas [85] y que estas células pueden generarse a partir de una respuesta de centro germinal así como de focos extrafolículos, los linfocitos T CD8+ que recibirían dicha señal podrían ser aquellos linfocitos T CD8+ foliculares que pueden expresar CXCR5 y migrar hacia la zona del folículo B (revisado por [180]), así como aquellos que permanecen en la zona T y que recibirían la señal de los linfocitos B provenientes de los focos extrafolículos, los cuales al parecer serían los que más IL-17A producen [85]. En relación a esto, los estudios de inmunofluorescencia de animales controles infectados con *T. cruzi*

mostraron que los linfocitos T se encuentran rodeando a los plasmoblastos extrafolliculares.

Seguidamente, tratamos a los animales depletados con dosis sostenidas de IL-6 o IL-17A recombinantes y evaluamos la magnitud, fenotipo y funcionalidad de la respuesta de linfocitos T CD8+ generada en comparación con el grupo depletado sin tratar. En relación al tratamiento con IL-6, no pudimos observar cambios en los parámetros estudiados sobre los linfocitos T CD8+, lo cual indica que el agregado de esta citoquina, a los valores ya existentes, no modifica la respuesta de estas células durante la infección aguda con *T. cruzi*. Por el contrario, el tratamiento de los animales deficientes en linfocitos B con IL-17A recombinante logró restablecer el porcentaje y número de linfocitos T CD8+ específicos a aquellos observados en los animales control infectados, así como el fenotipo efector y la funcionalidad de dichas células. De acuerdo a estas modificaciones, un menor parasitismo tisular fue observado en este grupo de animales tratados con IL-17A en comparación con los animales depletados de linfocitos B, lo cual reafirma reportes previos que demostraban la importancia que posee esta citoquina en el control de esta infección parasitaria [85, 97, 98]. De manera interesante, observamos una disminución significativa del parasitismo tisular de bazo y corazón en los animales depletados tratados con IL-17A en comparación con el grupo control infectado. Esto sugiere que la IL-17A no solamente podría actuar a nivel de la respuesta de los linfocitos T CD8+, sino que puede influenciar a otras poblaciones celulares capaces de controlar la replicación parasitaria como los macrófagos [181].

De manera interesante, los resultados observados durante el tratamiento con rIL-17A podrían ser explicados en el reporte publicado por Sullivan y colaboradores [138]. En dicho trabajo los autores observaron que animales deficientes en linfocitos B infectados sistémicamente con *T. cruzi* presentaban una respuesta de linfocitos T CD8+ disminuída, incluyendo un fenotipo de agotamiento celular. En dicho trabajo postularon que los anticuerpos específicos producidos por los linfocitos B son capaces de rescatar la respuesta de linfocitos T CD8+, ya que la transferencia pasiva del suero de animales infectados con *T. cruzi*, aunque no de ratones normales, revierte la magnitud, funcionalidad y el fenotipo de agotamiento observados en los linfocitos T CD8+ [138]. No obstante, los resultados descritos en esta tesis doctoral alertan sobre la posible presencia de IL-17A en el suero de los animales infectados utilizado para el tratamiento, lo que conllevaría a una incorrecta interpretación de los resultados que dichos autores proponen.

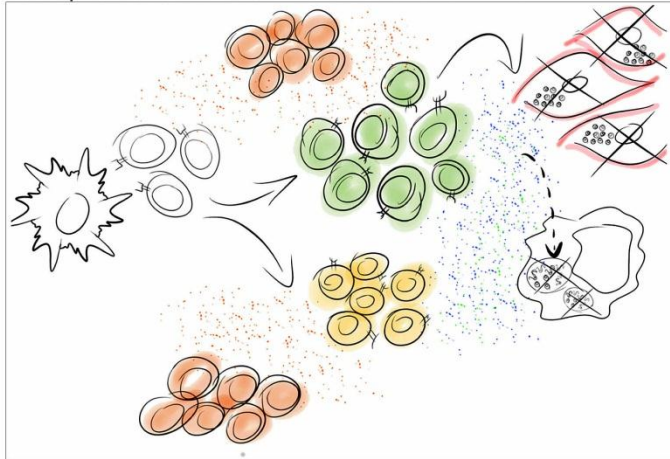
Debido a que el tratamiento con rIL-6 no logró modificar la respuesta de linfocitos T CD8+ en los animales depletados de linfocitos B, explicado en parte por la falta de diferencias en los niveles séricos de dicha citoquina entre, resultaría interesante evaluar otros diseños experimentales. Entre ellos, la evaluación del efecto








de dosis mayores de rIL-6 sería interesante ya que se describió que esta citoquina puede afectar a la respuesta de linfocitos T CD8+. Además, un tratamiento combinado de rIL-6 + rIL-17A sería atractivo para evaluar una posible sinergia en los efectos de ambas citoquinas sobre la respuesta de los linfocitos T CD8+ u otras poblaciones celulares.

Para finalizar, numerosos reportes alertan sobre el riesgo de infecciones virales asociadas al tratamiento con RTX en diferentes escenarios patológicos humanos [81, 82, 182-184]. Si este riesgo aumentado a contraer infecciones virales se encuentra asociado a una deficiente respuesta de linfocitos T CD8+ resta por ser dilucidado. En concordancia con esta observación, se ha encontrado que la terapia con RTX induce la depleción de linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con AR [77]. Además, el tratamiento con RTX a pacientes con crioglobulinemia mixta produjo una disminución del porcentaje de linfocitos T CD8+ activados [185, 186]. En definitiva, de manera análoga a los resultados descritos en esta tesis, los hallazgos obtenidos de los estudios del tratamiento con RTX sugieren que las infecciones secundarias asociadas a esta terapia podrían deberse en parte a una deficiente respuesta de linfocitos T CD8+.

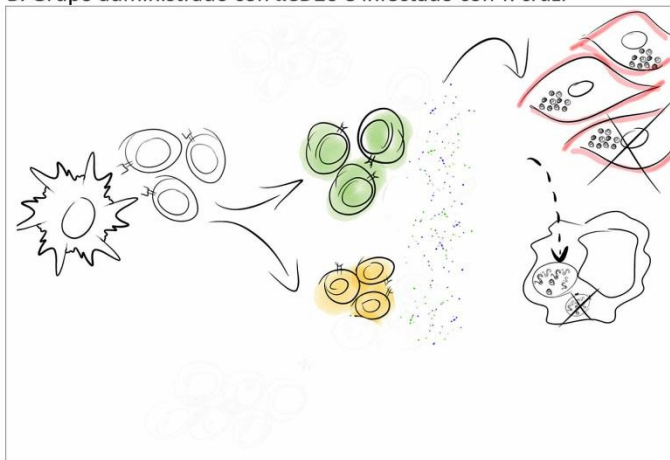
A modo de cierre, los resultados más relevantes descritos en este trabajo de tesis doctoral se resúmen en el siguiente modelo:

A. Grupo control infectado con *T. cruzi*



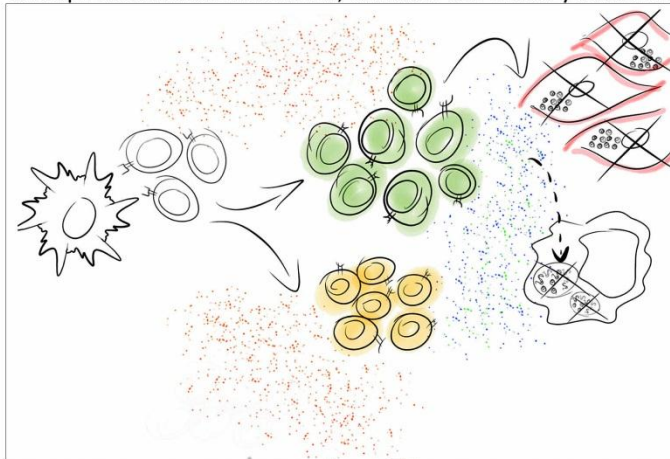
-  Linfocitos B
-  Linfocitos T CD8+ *naïve*
-  Linfocitos T CD8+ efectores
-  Linfocitos T CD8+ de memoria
-  Célula presentadora de antígeno
-  Macrófago infectado con *T. cruzi*
-  Cardiomiocitos infectados con *T. cruzi*

B. Grupo administrado con α CD20 e infectado con *T. cruzi*



-  IL-17A
-  IFN γ
-  TNF

C. Grupo administrado con α CD20, infectado con *T. cruzi* y tratado con rIL-17A



A. Durante la infección con *T. cruzi* los linfocitos B en su estadio de plasmoblasto extrafolicular y otras células no B esplénicas producen IL-17A. Esta citoquina actúa sobre los linfocitos T CD8+ favoreciendo su proliferación y supervivencia. Consecuentemente, numerosos linfocitos T CD8+ efectores y de memoria son generados. Estos linfocitos T CD8+ poseen una alta funcionalidad en cuanto a la

producción de citoquinas como IFN γ , la cual podría activar a los macrófagos infectados promoviendo la citotoxicidad directa del parásito. Por otra parte, la respuesta de linfocitos T CD8 $^{+}$ específicos generados es capaz de ejercer citotoxicidad de células infectadas, controlando parcialmente la infección.

B. La administración de α CD20 a los animales infectados con *T. cruzi* provoca la depleción total de los linfocitos B productores de IL-17A, afectando también a las células no B productoras de dicha citoquina. En consecuencia, una menor proliferación de los linfocitos T CD8 $^{+}$ totales y específicos es observada. A esto se suma una reducción en la generación de linfocitos T CD8 $^{+}$ efectores y de memoria. Los linfocitos T CD8 $^{+}$ presentan un aumento de los receptores inhibitorios acompañado de una reducida funcionalidad en cuanto a la producción de citoquinas. Finalmente la reducción en la funcionalidad y la disminución del número de linfocitos T CD8 $^{+}$ específicos conduce a una menor citotoxicidad de las células infectadas y por lo tanto un menor control del parásito a nivel tisular.

C. La rIL-17A inyectada a los ratones depletados sustituye a la citoquina endógena normalmente liberada por los linfocitos B y otras poblaciones celulares. Así, la presencia de esta citoquina logra restaurar la respuesta de linfocitos T CD8 $^{+}$ al mismo nivel que el grupo control. Adicionalmente, la rIL-17A actuaría sobre otras poblaciones celulares como los macrófagos, aumentando su funcionalidad y mejorando el control de la infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Para los experimentos realizados en este trabajo de tesis se utilizaron ratones C57BL/6 (Wild Type) o genéticamente modificados (μ MT) que a continuación se detallan:

- **Ratones C57BL/6**, provenientes de la Universidad Nacional de La Plata y endocriados en el Bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC, CIBICI-CONICET.

- **Ratones μ MT** (B6.129S2-Ighmtm1Cgn/J), provenientes del Bioterio del Seattle Children's Research Institute (Seattle, EEUU) y endocriados en el Bioterio arriba mencionado. Son ratones mutantes que carecen de linfocitos B maduros y tienen el background genético C57BL/6. El defecto genético lleva a una falta de expresión de IgM en la membrana celular. Estos ratones originalmente fueron donados por Klaus Rajewsky a The Jackson Laboratories.

En este trabajo de tesis se utilizaron principalmente ratones hembras de 6-8 semanas de edad, criados en un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas. Los animales se mantuvieron en el bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC, CIBICI-CONICET. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo estricta conformidad con las recomendaciones de la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del NIH y de la guía para el cuidado y uso de animales de experimentación publicada por el Consejo Canadiense de Protección de los Animales. Este trabajo contó la aprobación del comité de ética de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC (resolución HCD 274/09 y 981/13, y CICUAL Resoluc 854/18).

Reactivos

1 - Reactivos Químicos empleados en cultivos celulares y otras metodologías

Los medios de cultivo RPMI 1640, la solución tampón o *Buffer* Fosfato (PBS) pH 7.4, la L-glutamina (Glutamax), el ácido etildiaminotetraacético (EDTA) provienen de Life Technologies (Reino Unido). El Suero Bovino Fetal (SBF) fue adquirido a Natocor (Argentina). La gentamicina utilizada fue adquirida a FABRA (Grand Island, EEUU).

El 2-Mercaptoetanol, el Tetramethylrhodamine, Ethyl Ester, Perchlorate (TMRE), el carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), el agua DNA ultrapure, el buffer Tris-EDTA pH=8 y el TRIzol fueron adquiridos en Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific (USA).

El Percoll, el azul de tripán, el forbol miristrato acetato (PMA) y la ionomicina se compraron en Sigma-Aldrich Chemical Co (EEUU).

La heparina libre de aditivos de 5.000 U/mL fue provista por UENFAR (Alemania). El Tween-20 se compró en la empresa Biorad (EEUU). La empresa BD Biosciences (EEUU) nos proveyó del reactivo TMB, los buffers CytoFix/CytoPerm, Perm/Wash y GolgiStop. El buffer para lisar glóbulos rojos (Tris-cloruro de amonio), el Cell Proliferation Dye eFluor™ 670, la Brefeldina, monensina y el kit de Buffers “Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set” empleados se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific (EEUU).

El ácido sulfúrico, el etanol, el cloroformo y el metanol utilizados fueron de Cicarelli (Argentina), Taurus (Argentina) y J.T.Backer Chemicals (EEUU). Otros reactivos como cloruro de amonio, Tris, fosfato de sodio, cloruro de sodio, carbonato de sodio, glucosa provienen de la empresa Anedra (Nueva Zelanda).

Los reactivos de biología molecular utilizados para la PCR en tiempo real se adquirieron en la empresa Applied Biosystem (EEUU).

2 - Anticuerpos para citometría de flujo

Los experimentos desarrollados en el presente trabajo de tesis involucraron los Acm conjugados a fluorocromos que se encuentran detallados en orden alfabético a continuación:

Especificidad	Clon	Fluorocromo*	Marca comercial*
B220	RA3-6B2	PeCy7	TFS
B220	RA3-6B2	PE	B
CD107a	eBio1D4B	PE	TFS
CD11a	M17/4	PerCp-eFluor 710	TFS
CD138	MA5-23553	APC	TFS
CD19	eBio1D3	PerCp-Cy5.5	TFS
CD3	500A2	Alexa Fluor 488	I
CD3	145-2C11	PerCp-Cy5.5	TFS
CD44	IM7	FITC	TFS
CD62-L	MEL-14	PerCp-Cy5.5	TFS
CD8	53-6.7	Alexa Fluor 647	B
CD8	53-6.7	FITC, APC-eFluor 780	TFS
EOMES	Dan11mag	PE	TFS
IFN γ	XMG1.2	APC	TFS
IL-10	JES5-16E3	APC	TFS
IL-17A	eBio17B7	PE	TFS
IL-6	MP5-20F3	PE	TFS

IL-7R α	A7R34	PE	TFS
Ki-67	SolA15	PE	TFS
KLRG-1	2F1	PeCy7	TFS
LAG-3	eBioC9B7W	PeCy7	TFS
PD-1	RMPI-30	PE, PeCy7	TFS
Tbet	4B10	PeCy7	B
TIGIT	GIGD7	PerCp-eFluor 710	TFS
TNF	MP6-XT22	PerCp-Cy5.5	TFS

(*) APC: Allofocianina; FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PEcy7: Ficoeritrina conjugada con cianina; PerCP: Proteína clorofila peridina; PerCPCy5.5: Proteína clorofila peridina conjugada con cianina; APC-eFluor 780: allofocianina conjugada con el colorante fluorescente orgánico eFluor 780; PerCP-eFluor 710: Proteína clorofila peridina conjugada con el colorante fluorescente orgánico eFluor 710. TFS: Thermo Fischer Scientific. B: Biolegend. I: Invitrogen

3 - Anticuerpos utilizados para la depleción *in vivo* de linfocitos B y citoquinas recombinantes

- Acm anti-CD20: anticuerpo de ratón de isotipo IgG2a específico para la molécula CD20 de ratón (Clon: 5D2) donado por Genentech – EEUU. Una única inyección de 50 μ g/ratón produce una depleción del 90% de los linfocitos B a los 7 días post tratamiento [160], siendo el hígado un órgano clave para la eliminación de estas células [75].
- Acm IgG2a: anticuerpo de ratón del mismo isotipo que el Acm anti-CD20 pero que reconoce moléculas irrelevantes en el sistema y provisto por Bio-X-Cell – EEUU. Clon: C1.18.4. Este anticuerpo se utilizó como control de isotipo.
- rIL-6; rIL-17A: proteínas recombinantes biológicamente activas para el sistema murino, adquiridas en la empresa Shenandoah – EEUU.

4 - Antígenos

- Tskb20 (ANYKFTLV) y Tskb18 (ANYDFTLV): péptidos provistos por la empresa Genscript Inc. correspondientes a epitopes de la enzima transalidasa del *T. cruzi* [133].
- Pa8 (VNHRFTLV): Péptido provisto por la empresa Genscript Inc. correspondiente a un epitope de la proteína de superficie del amastigote (ASP, de sus siglas en inglés amastigote surface protein)-2 de *T. cruzi* [130].

5 - Tetrámeros

- TSKB20/H-2k(b): Tetrámero de H-2k (CMH-I de la cepa C57BL/6) conjugado con el péptido Tskb20 y el fluorocromo APC (donado por NIH Tetramer Core Facility).
- Tskb18/H-2k(b): Tetrámero de H-2k (CMH-I de la cepa C57BL/6) conjugado con el péptido Tskb18 y el fluorocromo APC (donado por NIH Tetramer Core Facility).

6 - Reactivos de ELISA

Los reactivos para la determinación de la concentración de IL-6 e IL-17A en plasma fueron provistos por Thermo Fisher Scientific (EEUU) en el formato Anti-mouse ELISA Ready-SET-Go! que incluye: Anticuerpos de captura (purified) y biotinilados, estreptavidina conjugada con peroxidasa e IL-6 y IL-17A recombinantes. Las placas utilizadas para el ensayo fueron placas Costar high binding half area de la empresa Fisher scientific (EEUU).

7 - Colorante vital Fixable Viability Stain

Para la exclusión de las células muertas en los análisis de citometría de flujo se utilizaron los colorantes vitales Fixable Viability Stain 780 y Fixable Viability Stain 700 de la empresa BD Biosciences (EEUU)

Parásitos e Infección

1 - Mantenimiento de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* y obtención de tripomastigotes de sangre de ratón

Los tripomastigotes de la cepa Tulahuén se mantuvieron a través de pases en BALB/c machos. Dos animales por cada pase se infectaron intraperitonealmente con 1.10^6 parásitos contenidos en 200 μ L de PBS. A los 10-11 días post infección (dpi), la sangre de éstos animales sirvió como fuente de tripomastigotes para mantener la cepa o infectar ratones según el modelo experimental propuesto.

2 - Infección con *T. cruzi*

Ratones C57BL/6 WT fueron infectados por vía intraperitoneal con 5.000 tripomastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuén, diluidos en 200µL de PBS. Las dosis de parásito fueron seleccionadas de forma que la mayoría de los ratones WT sobreviven la etapa aguda de infección y progresan a la cronicidad. Según el caso, los animales se sacrificaron a distintos tiempos de infección para realizar estudios en distintos órganos, o bien su sangre fue obtenida periódicamente a fines de establecer los niveles de parasitemia. Ratones no infectados se utilizaron como grupo control.

3 - Determinación de la parasitemia

La parasitemia fue medida por recuento de tripomastigotes viables en una cámara de Neubauer. Para ello, la sangre heparinizada de ratones infectados fue incubada con una solución 0,87% de cloruro de amonio (proporción 1/10 o 1/20) para lisar los glóbulos rojos. La suspensión obtenida fue cargada en la cámara de Neubauer y los parásitos móviles fueron contados en 4 cuadrantes. El número obtenido fue referido a la dilución realizada y multiplicada por 10 y por 1000 para expresar el valor por ml de sangre.

4 - Monitoreo de la infección aguda

Los controles de supervivencia se realizaron generalmente cada 48 horas y cada 24 horas en tiempos cercanos al pico de parasitemia (20 dpi). También se evaluó el estado general de los animales. Según las normas de cuidado de animales, los ratones que mostraron una pérdida del peso corporal de más del 20% del peso original fueron sacrificados.

Tratamiento *in vivo* de ratones

1 - Administración del Acm anti-CD20 y su control (IgG2a)

La depleción de los linfocitos B se llevó a cabo a través de la inyección intraperitoneal de 50µg del anticuerpo monoclonal IgG2a dirigido contra la molécula CD20 de ratón (Genentech - clón: 5D2), contenido en 200µL de PBS estéril. El esquema de depleción consistió en una sola inyección a los 8 días previos al momento de la infección de los ratones o al día 12pi según se detalla en los experimentos. El grupo de ratones control fue inyectado por vía intraperitoneal con 50µg de un anticuerpo monoclonal IgG2a de ratón con especificidad no relacionada (BioXCell - clón: C1.18.4), siguiendo el mismo esquema de tratamiento. La efectividad de la depleción de

linfocitos B fue corroborada mediante su evaluación por citometría de flujo, a diferentes días post inyección, durante el seteo del sistema. Una vez instaurado el esquema de depleción, la efectividad de la misma fue evaluada en el punto final de cada experimento. El tratamiento con anti-CD20 (α CD20) fue eficaz en aproximadamente un 80% de los individuos inyectados a lo largo de los experimentos. Aquellos individuos que no lograron una correcta depleción de linfocitos B posterior al tratamiento con α CD20 (20% restante) fueron descartados.

2 - Tratamiento con IL-6 e IL-17A recombinantes

El tratamiento con citoquinas recombinantes se llevó a cabo mediante la inyección intraperitoneal de 250ng de IL-6 (Shenandoah - EEUU) o 500ng de IL-17A (Shenandoah - EEUU), por ratón, contenidas en 100 μ L de PBS estéril a los días 12, 14, 16 y 18 pi. El régimen de inyección se estableció de acuerdo a la cinética de aparición de las células productoras de dichas citoquinas en los animales infectados con *T. cruzi* como se muestra en la Figura 24B. La dosis de IL-6 se estableció según reportes previos que mostraban actividad biológica luego de la inyección de esta citoquina entre el rango de 200 y 900 ng [187-189]. La cantidad de IL-17A se eligió en función de reportes que mostraron que entre 500-1000ng se encontraba la menor dosis capaz de producir efectos biológicos *in vivo* luego de una inyección intraperitoneal en ratones [190-192]. Como control del tratamiento con las citoquinas, el grupo de animales depletados de linfocitos B fue inyectado con 100 μ L de PBS estéril, según el mismo esquema descripto.

Obtención de sangre y plasma

1 - Sangre

Para la realización del control de la depleción de los linfocitos B y la determinación de las parasitemias, la sangre de los ratones fue recolectada a partir de un pequeño corte en la vena de la cola. Para la determinación de linfocitos T CD8+ específicos para *T. cruzi* en sangre (experimentos de “punto final”), la misma fue recolectada a partir del seno retro-orbital utilizando pipetas *Pasteur* de vidrio conteniendo 10 μ L de heparina.

2 – Plasma

Para la cuantificación de las citoquinas IL-6 e IL-7A en plasma, la sangre de los diferentes grupos de ratones fue obtenida del seno retro-orbital utilizando pipetas *Pasteur* de vidrio conteniendo 10µL de heparina y recogida en un tubo tipo *ependorf*. Para proceder a la separación del plasma, el tubo fue centrifugado a 3000 rpm durante 8 minutos. Las muestras de plasma fueron colocadas en un nuevo tubo *ependorf* y conservadas en un freezer de -80°C hasta su análisis.

Obtención de las suspensiones celulares de diferentes órganos

1 – Bazo

Una vez sacrificados los animales, se extrajeron distintos órganos en condiciones de esterilidad. Los bazos se colocaron sobre mallas metálicas de acero inoxidable, colocadas dentro de cápsulas de Petri de 30mm conteniendo 3mL de solución fisiológica (SF) al 2% de SBF (Natocor - Córdoba). Con ayuda de émbolos estériles, los bazos se disgregaron mecánicamente, formando suspensiones celulares que se centrifugaron 5 min a 2000 rpm. Para eliminar los glóbulos rojos contenidos en la muestra, los *pellets* celulares fueron tratados con 3mL de *buffer* de lisis (*buffer* amoníaco-cloruro-potasio (ACK), pH=7,5, a una concentración de 8,3g/L de NH₄Cl y 1,0g/L de KHCO₃ Thermo Fisher). Transcurridos 5 min, se agregaron 7mL de SF-2% SBF para inactivar la lisis y los leucocitos resultantes se lavaron dos veces (cada lavado consistió en agregar SF-SBF 2%, centrifugar 5 min a 2000 rpm y descartar el sobrenadante). Finalmente las células se resuspendieron en SF-2% SBF y se mantuvieron en hielo hasta su uso. La cantidad de leucocitos viables se determinó contando en cámara de Neubauer, realizando una dilución de las células en el colorante vital Azul de Tripán (GIBCO).

2 – Hígado

Los hígados también se colocaron sobre mallas metálicas de acero inoxidable alojadas dentro de cápsulas de Petri de 60mm conteniendo 6mL de SF al 2% SBF. Con ayuda de émbolos estériles, los hígados se disgregaron mecánicamente, formando suspensiones celulares que fueron centrifugadas 5 min a 2000 rpm. Se realizó una separación de leucocitos por gradiente de densidad de Percoll (Sigma). El pellet de células se resuspendió en 4mL de Percoll al 35% en RPMI y se depositó

cuidadosamente sobre 2,5mL de Percoll al 70% en PBS. Los gradientes resultantes se centrifugaron 20 min a 600g, sin aceleración ni freno, y a temperatura ambiente. Se descartó la fase superior (residuos celulares) y se conservó la interfase donde se ubicaron los leucocitos y los glóbulos rojos. Posteriormente las células fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos y al pellet celular se le realizó una lisis de glóbulos rojos al igual que en el bazo (aunque en este caso solamente se utilizó 0,5-1 mL de *buffer* de lisis). La lisis fue detenida mediante el agregado de 5 mL de SF-2%SBF. Luego, las células fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos y finalmente se realizó un último lavado para eliminar los restos de Percoll presente, ya que es tóxico para las células. Finalmente las células lavadas fueron resuspendidas y contadas de la misma manera que las células de bazo.

Cultivos celulares

Para cultivo celular, las suspensiones celulares se centrifugaron y, según se indica en cada caso, se llevaron a diferentes concentraciones según el ensayo (desde $2 \cdot 10^6$ /mL a $20 \cdot 10^6$ /mL en RPMI completo, RPMI al 10% de SBF, 0,002M de L-glutamina, 50 μ M de 2-mercaptoetanol, y 40 μ g/mL de gentamicina). De acuerdo a las particularidades de cada experimento y como se indica en las leyendas de las figuras, las células se cultivaron en un rango variable de tiempo, en medio solo o en presencia de distintos estímulos. Los cultivos se hicieron a una atmósfera constante de 5% de CO₂ y 37 °C. Los estímulos utilizados fueron:

- Estímulos con PMA/Ionomicina (utilizado en citometría para el estudio de la producción intracelular de citoquinas y la degranulación, cultivo 5horas). Se utilizó 0,1 μ g/mL PMA (Sigma) y 0,5 μ g/mL Ionomicina (Sigma) en presencia de brefeldina A (Thermo Fisher Scientific) y monensina (Thermo Fisher Scientific).
- Estímulos con péptido TSKB20 de *T. cruzi* (utilizado en citometría para el estudio de la producción intracelular de citoquinas y la degranulación frente a un estímulo específico. Para estudios de funcionalidad, los LiT CD8+ fueron estimulados con 5 μ g/mL de TSKB20 (Genscript Inc.). Estos cultivos se hicieron en presencia de brefeldina A y monensina (Thermo Fisher Scientific) durante 5 horas.
- Para los ensayos de citotoxicidad *in vivo*, las células totales de bazo de los ratones μ MT (sin linfocitos B) fueron cultivadas durante 1 hora con los diferentes péptidos de *T. cruzi* (TSKB20, TSKB18 y PA8; 0,5 μ M) o incubadas en medio de cultivo completo solamente.

Marcación de células con colorantes vitales

- Para los ensayos de citometría de flujo, las suspensiones celulares fueron teñidas previamente con 20µL de los colorantes Fixable Viability Stain (BD Biosciences) en una dilución 1/1000 en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Para el ensayo de citotoxicidad *in vivo*, las distintas poblaciones de células a teñir fueron lavadas y diluidas a una densidad de $20 \cdot 10^6$ células/mL con PBS-SBF 1%. A esta suspensión celular se le agregó igual volumen de una solución de CFSE o eFluor 670, según corresponda. Las concentraciones de las soluciones de CFSE fueron de 2 y 20µM. Mientras tanto la concentración de eFluor 670 fue de 3µM. La mezcla células/colorante vital a la concentración indicada, fue incubada por 8 minutos a 37°C, y posteriormente se agregó igual volumen de RPMI completo gota a gota para inactivar la tinción. Las células marcadas fueron posteriormente lavadas con RPMI completo y se mantuvieron en reposo durante 30 minutos a 37°C antes de su recuento en cámara de Neubauer con azul de tripán. Con objeto de transferirlas a ratones vivos, se las lavó 3 veces con PBS y se las llevó a la densidad especificada.

Ensayos celulares

1 - Marcación de superficie

- **Determinación de linfocitos T CD8+ específicos para el tetrámero TSKB20**

Para determinar la frecuencia de los linfocitos T CD8+ específicos para antígenos del *T. cruzi*, el *pellet* de 2×10^6 de células fue resuspendido en 20µL de SF-SBF 2% conteniendo la dilución apropiada del tetrámero TSKB20/H-2k(b) (descrito en la sección de Reactivos). Luego de 20 minutos de incubación a 4°C, las células fueron lavadas y resuspendidas en las diluciones apropiadas de anticuerpos para evaluar la expresión de las diferentes moléculas de superficie e intracelulares.

- **Determinación de moléculas de superficie por citometría de flujo**

Posterior a la tinción con los colorantes vitales y el tetrámero (en los casos en los que éste fue utilizado), el *pellet* de 2×10^6 de células fue resuspendido en 20µL de SF-SBF 2% conteniendo las diluciones apropiadas de los anticuerpos conjugados a fluorocromos específicos para distintas moléculas de superficie a determinar. Luego de 20 minutos de incubación a 4°C, las células fueron lavadas y resuspendidas en SF al 2%

de SBF. Finalmente se adquirieron en los citómetros de flujo *FACS Canto II* (BD Biosciences) o *Attune NxT* (Thermo Fischer Scientific) y se analizaron en todos los casos con el software *FlowJo*.

2 - Marcación intracelular

- **Citoquinas Intracelulares**

La determinación de citoquinas intracelulares se realizó por citometría de flujo luego del cultivo, en presencia o ausencia de estímulos, con inhibidores del transporte vesicular (monensina o brefeldina A) durante 5 horas. Los estímulos utilizados se especifican en las leyendas de las figuras y en la sección “Cultivos Celulares”. Transcurridas 5 horas de cultivo, la tinción de las moléculas de superficie fue realizada de la manera descrita arriba, en el punto 1 de esta sección. Posteriormente, las células fueron lavadas con SF-al 2% SBF y fijadas y permeabilizadas con los buffers comerciales *Cytofix/Cytoperm* y *Perm/Wash* (BD Biosciences), siguiendo instrucciones del fabricante. La tinción con los anticuerpos específicos para las proteínas intracelulares se hizo a temperatura ambiente en *Perm/Wash*, durante 30 minutos. Tras un último lavado, las células se resuspendieron en SF al 2% SBF y fueron adquiridas en el citómetro de flujo.

- **Factores de transcripción**

La determinación de los factores de transcripción se realizó por citometría de flujo. Transcurrida la tinción de las moléculas de superficie, las células fueron fijadas y permeabilizadas con los buffers comerciales “*Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set*” (Thermo Fisher Scientific), siguiendo instrucciones del fabricante. La tinción con los anticuerpos específicos para los factores de transcripción se realizó a temperatura ambiente en *Perm/Wash*, durante 30 minutos. Tras un último lavado, las células se resuspendieron en SF-SBF 2% y fueron adquiridas en el citómetro de flujo.

3 - Ensayo de citotoxicidad *in vivo* evaluado por citometría de flujo

El ensayo realizado comprende una modificación de los protocolos previamente descritos [157, 193]. Para realizarlo, células de bazo de ratones μ MT no infectados fueron pulsadas durante 1 hora en RPMI completo en presencia de los péptidos de *T. cruzi* (TSKB20, TSKB18 o PA8 según se indique) a una concentración de $1\mu\text{g}/\text{mL}$ (células blanco). Al mismo tiempo, esplenocitos de ratones μ MT fueron cultivados en ausencia de péptido (células control). Luego del cultivo, las células blanco y controles se lavaron dos veces con PBS y se tiñeron con CFSE y/o eFluor670 como fue

descripto en la sección “Marcación de células con colorantes vitales” mediante el siguiente esquema:

Condición	CFSE (μM)	eFluor670 (μM)	Perfil de fluorescencia
Medio (células control)	20	3	CFSE ^{alto} eFluor ⁺
TSKB20 (células blanco)	20	-	CFSE ^{alto} eFluor ⁻
TSKB18 (células blanco)	-	3	CFSE ⁻ eFluor ⁺
PA8 (células blanco)	2	-	CFSE ^{bajo} eFluor ⁻

Terminado el protocolo de tinción, las tres poblaciones de células blanco y las células control fueron contadas, mezcladas en iguales cantidades e inyectadas en el seno retro-orbital de ratones Control y depletados de linfocitos B al día 20 pi. Ratones no infectados fueron inyectados con la misma mezcla, como grupo control. Los ratones fueron sacrificados 4 horas después de la transferencia. Los porcentajes de células transferidas presentes en los ratones control y depletados fueron determinados en el bazo e hígado mediante citometría de flujo. Para el análisis de la citotoxicidad se seleccionó cada una de las poblaciones de células blanco (por separado), sumado a la población de células control. El porcentaje de citotoxicidad para las células presentando/exhibiendo cada uno de los antígenos se calculó según la siguiente fórmula:

iAntígenoX: % de células cargadas con el antígeno X en ratones infectados.

iControl: % de células control en ratones infectados.

nAntígenoX: % de células cargadas con el antígeno X en ratones no-infectados.

nControl: % de células control en ratones no-infectados.

Siendo X = TSKB20 o TSKB18 o PA8

$$\% \text{ de Citotoxicidad} = 100 - \left(\frac{(i\text{AntígenoX}) / (i\text{Control}) \times 100}{(n\text{AntígenoX}) / (n\text{Control})} \right)$$

4 - Tinción con TMRE: Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo

EL TMRE es un colorante permeable a la membrana celular que emite fluorescencia en el canal de la ficoeritrina (PE). Por su carga positiva se acumula en

mitocondrias activas que tienen una carga relativa negativa, así las mitocondrias depolarizadas o inactivas poseen un menor potencial de membrana y fallan en secuestrar TMRE. Para realizar la tinción, células de bazo de animales control o administrados con α CD20 fueron obtenidas a los 20 dpi. Posteriormente a la tinción de superficie, las células fueron lavadas en buffer HEPES 25mM y teñidas en una solución de TMRE 1nM en buffer HEPES por 30 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron y adquirieron inmediatamente en el citómetro de flujo. Las células no apoptóticas fueron identificadas como TMRE+.

5 - Determinación de la movilización de CD107a a la superficie celular mediante citometría de flujo

Como determinación indirecta de la capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8+ se realizaron ensayos de degranulación basados en la determinación de la movilización de CD107a a la superficie celular. La molécula CD107a es una proteína intracelular ampliamente expresada en la membrana lisosomal/endosomal y puede expresarse en la superficie de linfocitos T CD8+ y células NK de forma transitoria (ya que se internaliza rápidamente por la vía endocítica) luego de que las mismas degranulan. Para determinar la movilización de CD107a a la superficie en respuesta al péptido parasitario específico o al estímulo mitogénico, se realizaron cultivos similares para la determinación de citoquinas intracelulares, pero en presencia del Acm anti-CD107a conjugado a un fluorocromo, desde el inicio del cultivo. Además, se utilizó monensina y brefeldina A considerando que la monensina además de impedir el transporte vesicular, impide la acidificación de lisosomas y previene entonces la desnaturalización del anticuerpo que pueda haberse internalizado como consecuencia de la endocitosis del CD107a.

6 - Gráficos de citometría de flujo, porcentajes y números

En todos los gráficos de dos parámetros la región marcada con cuadrados, rectángulos o círculos y el número contiguo a dicha forma corresponden a la delimitación de la población estudiada en cada caso y su porcentaje respectivamente. Los números de células correspondientes a las diferentes poblaciones estudiadas se obtuvieron mediante los porcentajes obtenidos en la citometría y refiriéndolo al total de células mononucleares esplénicas contadas en cámara de Neubauer.

Cuantificación de citoquinas por ELISA

La determinación de citoquinas plasmáticas fue realizada utilizando kits de ELISA comerciales, según especificaciones del fabricante. Brevemente, placas de 96 pocillos *high binding* fueron sensibilizadas a 4°C durante la noche con 25 μ L de una dilución del

anticuerpo de captura en el buffer de sensibilización apropiado para cada analito (buffer carbonato pH 9,6 o PBS pH 7,2). Posteriormente y luego de 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0,05%, las placas fueron bloqueadas con 100 μ L de PBS al 10% de SBF durante 2 horas a temperatura ambiente, en una cámara húmeda. Después, el bloqueante fue descartado y la placa fue lavada 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, 25 μ L de las muestras puras y de diluciones seriadas de los testigos (citoquinas recombinantes) fueron sembradas sobre la placa e incubadas durante toda la noche a 4°C, o 2 horas a temperatura ambiente, en una cámara húmeda. Seguidamente, las placas fueron lavadas 5 veces e incubadas 1,5 horas a temperatura ambiente con 25 μ L del anticuerpo secundario conjugado a biotina diluido en buffer de bloqueo. Posterior a 5 nuevos lavados, 25 μ L de estreptavidina conjugada a peroxidasa fueron agregados e incubados 25min a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 5 veces y se incubaron con 40 μ L del reactivo de color TMB (BD Biosciences), conteniendo el sustrato de la enzima y el cromógeno. Entre 5 y 30 minutos de incubación, la reacción se inactivó con 40 μ L de ácido sulfúrico 2N y se midió la absorbancia a 450nm en un lector de placas de ELISA.

Inmunofluorescencia sobre cortes de bazo

1 - Obtención de secciones histológicas de bazo

Bazos de ratones controles o depletados con α CD20 fueron obtenidos y congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. Se efectuaron tacos por congelación con OCT y se obtuvieron criosecciones de 7 μ m de espesor. Las secciones fueron fijadas en acetona durante 10 min a -20 °C, secadas a temperatura ambiente durante 10 min y luego rehidratadas en buffer TRIS. Posteriormente, las secciones fueron bloqueadas durante 30 min a temperatura ambiente con TRIS-10% suero normal de ratón. A continuación, las secciones fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda con diferentes combinaciones de anticuerpos unidos a fluorocromos en buffer TRIS. Finalmente, las secciones fueron montadas con FluorSave (Merck Millipore) y observadas bajo microscopio confocal Olympus FV1200. Las imágenes fueron procesadas con Adobe Photoshop.

Ensayos de biología molecular

1 - Extracción de ADN

La extracción de ADN de tejidos (bazo, hígado, corazón) se realizó a partir de secciones de órganos que se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento. El ADN total se extrajo empleando reactivo de TRIzol (Life Technologies), según instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras fueron homogeneizadas mecánicamente en 1mL de TRIzol. Posteriormente, se agregaron 0,2mL de cloroformo por cada 1mL de TRIzol, y se conservaron la fase fenol-cloroformo y la interfase conteniendo el ADN. Tras su precipitación con 0,3mL de etanol al 100%, el ADN se lavó dos veces con una solución citrato de sodio/etanol (0.1M citrato de sodio en 10% de etanol, pH=8,5) y luego una vez con etanol al 75%. Finalmente se resuspendió en *buffer* Tris-EDTA pH=8. Las concentraciones de ADN se determinaron por espectrofotometría, midiendo absorbancia a 260nm en BIOTEK *microplate spectrophotometer* (BioTek Instruments, Inc.).

2 - PCR en tiempo real para la cuantificación de ADN de *T. cruzi*

Para realizar esta técnica, los cebadores o *primers* de secuencia personalizada (Applied Biosystem) específicos para ADN satélite de *T. cruzi* (GenBank AY520036), fueron diseñados según resultados publicados por Piron y colaboradores [194] y asociados a sondas o *probes* tipo TaqMan. Además, la cantidad de ADN de parásito se relativizó a GAPDH, utilizando *TaqMan Rodent GAPDH control Reagent* de Applied Biosystem. Las sondas estuvieron conjugadas a FAM (6-carboxifluoresceína) y utilizaron TMRA (tetrametilrodamina) como colorante *quencher*. El secuenciador utilizado en ambos casos fue ABI PRISM 7700 *Sequence Detector* (Perkin-Elmer Applied Biosystem) y el procedimiento respetó las instrucciones del fabricante para ensayos con sondas *probe* tipo TaqMan. El análisis de los resultados se realizó con el software StepOne. Los ciclos umbrales (Ct por sus siglas en inglés, *Cycle threshold*) fueron definidos como el número de ciclos requeridos para alcanzar un umbral de fluorescencia arbitrariamente fijado en etapas donde el logaritmo de la señal se aproximaba a una recta (fase de expansión logarítmica). Se graficó la cantidad relativa del gen *target* según la fórmula $2^{-\delta Ct}$ ajustada a unidades relativas, donde δCt es la relación entre el Ct del gen *target* y el Ct del gen *housekeeping* o control.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 5.0. De acuerdo con el tipo de comparaciones que se realizó y el diseño del experimento, se utilizaron los siguientes análisis: *T de Student* o ANOVA de dos vías seguidos del *post-test* de Bonferroni. Los valores de p menores a 0.05 se consideraron significativos (95%

de confianza). Los datos de los análisis estadísticos se muestran como el valor promedio del porcentaje o número obtenido \pm desviación estándar (DE).

BIBLIOGRAFÍA

1. Raff, M. C., Megson, M., Owen, J. J. & Cooper, M. D. (1976) Early production of intracellular IgM by B-lymphocyte precursors in mouse, *Nature*. **259**, 224-6.
2. Gathings, W. E., Lawton, A. R. & Cooper, M. D. (1977) Immunofluorescent studies of the development of pre-B cells, B lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans, *European journal of immunology*. **7**, 804-10.
3. LeBien, T. W. & Tedder, T. F. (2008) B lymphocytes: how they develop and function, *Blood*. **112**, 1570-80.
4. Alt, F. W. e., Honjo, T. e., Radbruch, A. e. & Reth, M. e. *Molecular biology of B cells*, Second edition / edited by Frederick W. Alt, Tasuku Honjo, Andreas Radbruch, Michael Reth. edn.
5. Bos, N. A., Kimura, H., Meeuwse, C. G., De Visser, H., Hazenberg, M. P., Wostmann, B. S., Pleasants, J. R., Benner, R. & Marcus, D. M. (1989) Serum immunoglobulin levels and naturally occurring antibodies against carbohydrate antigens in germ-free BALB/c mice fed chemically defined ultrafiltered diet, *European journal of immunology*. **19**, 2335-9.
6. Hayakawa, K., Hardy, R. R., Parks, D. R. & Herzenberg, L. A. (1983) The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice, *The Journal of experimental medicine*. **157**, 202-18.
7. Hayakawa, K., Hardy, R. R., Herzenberg, L. A. & Herzenberg, L. A. (1985) Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells, *The Journal of experimental medicine*. **161**, 1554-68.
8. Allman, D. & Pillai, S. (2008) Peripheral B cell subsets, *Current opinion in immunology*. **20**, 149-57.
9. Stashenko, P., Nadler, L. M., Hardy, R. & Schlossman, S. F. (1980) Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen, *Journal of immunology*. **125**, 1678-85.
10. Tedder, T. F. (2009) CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis, *Nature reviews Rheumatology*. **5**, 572-7.
11. Thomas, M. L. (1989) The leukocyte common antigen family, *Annual review of immunology*. **7**, 339-69.
12. Vyas, J. M., Van der Veen, A. G. & Ploegh, H. L. (2008) The known unknowns of antigen processing and presentation, *Nature reviews Immunology*. **8**, 607-18.
13. Hoffman, W., Lakkis, F. G. & Chalasani, G. (2016) B Cells, Antibodies, and More, *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. **11**, 137-54.
14. Gray, D., Gray, M. & Barr, T. (2007) Innate responses of B cells, *European journal of immunology*. **37**, 3304-10.
15. Lund, F. E., Hollifield, M., Schuer, K., Lines, J. L., Randall, T. D. & Garvy, B. A. (2006) B cells are required for generation of protective effector and memory CD4 cells in response to *Pneumocystis* lung infection, *Journal of immunology*. **176**, 6147-54.
16. Barr, T. A., Brown, S., Mastroeni, P. & Gray, D. (2010) TLR and B cell receptor signals to B cells differentially program primary and memory Th1 responses to *Salmonella enterica*, *Journal of immunology*. **185**, 2783-9.
17. Shen, H., Whitmire, J. K., Fan, X., Shedlock, D. J., Kaech, S. M. & Ahmed, R. (2003) A specific role for B cells in the generation of CD8 T cell memory by recombinant *Listeria monocytogenes*, *Journal of immunology*. **170**, 1443-51.
18. Giles, J. R., Kashgarian, M., Koni, P. A. & Shlomchik, M. J. (2015) B Cell-Specific MHC Class II Deletion Reveals Multiple Nonredundant Roles for B Cell Antigen Presentation in Murine Lupus, *Journal of immunology*. **195**, 2571-9.
19. Noorchashm, H., Reed, A. J., Rostami, S. Y., Mozaffari, R., Zekavat, G., Koeberlein, B., Caton, A. J. & Najj, A. (2006) B cell-mediated antigen presentation is required for the pathogenesis of acute cardiac allograft rejection, *Journal of immunology*. **177**, 7715-22.
20. Yarovinsky, F., Kanzler, H., Hieny, S., Coffman, R. L. & Sher, A. (2006) Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4+ T cell response, *Immunity*. **25**, 655-64.

21. Zhong, G., Reis e Sousa, C. & Germain, R. N. (1997) Antigen-unspecific B cells and lymphoid dendritic cells both show extensive surface expression of processed antigen-major histocompatibility complex class II complexes after soluble protein exposure in vivo or in vitro, *The Journal of experimental medicine*. **186**, 673-82.
22. Crawford, A., Macleod, M., Schumacher, T., Corlett, L. & Gray, D. (2006) Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells, *Journal of immunology*. **176**, 3498-506.
23. Shen, P. & Fillatreau, S. (2015) Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines, *Nature reviews Immunology*. **15**, 441-51.
24. Endres, R., Alimzhanov, M. B., Plitz, T., Futterer, A., Kosco-Vilbois, M. H., Nedospasov, S. A., Rajewsky, K. & Pfeffer, K. (1999) Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells, *The Journal of experimental medicine*. **189**, 159-68.
25. Tumanov, A., Kuprash, D., Lagarkova, M., Grivennikov, S., Abe, K., Shakhov, A., Drutskaya, L., Stewart, C., Chervonsky, A. & Nedospasov, S. (2002) Distinct role of surface lymphotoxin expressed by B cells in the organization of secondary lymphoid tissues, *Immunity*. **17**, 239-50.
26. Fu, Y. X., Huang, G., Wang, Y. & Chaplin, D. D. (1998) B lymphocytes induce the formation of follicular dendritic cell clusters in a lymphotoxin alpha-dependent fashion, *The Journal of experimental medicine*. **187**, 1009-18.
27. Ngo, V. N., Cornall, R. J. & Cyster, J. G. (2001) Splenic T zone development is B cell dependent, *The Journal of experimental medicine*. **194**, 1649-60.
28. Tumanov, A. V., Grivennikov, S. I., Kruglov, A. A., Shebzukhov, Y. V., Koroleva, E. P., Piao, Y., Cui, C. Y., Kuprash, D. V. & Nedospasov, S. A. (2010) Cellular source and molecular form of TNF specify its distinct functions in organization of secondary lymphoid organs, *Blood*. **116**, 3456-64.
29. Angeli, V., Ginhoux, F., Llodra, J., Quemeneur, L., Frenette, P. S., Skobe, M., Jessberger, R., Merad, M. & Randolph, G. J. (2006) B cell-driven lymphangiogenesis in inflamed lymph nodes enhances dendritic cell mobilization, *Immunity*. **24**, 203-15.
30. Kumar, V., Scandella, E., Danuser, R., Onder, L., Nitschke, M., Fukui, Y., Halin, C., Ludewig, B. & Stein, J. V. (2010) Global lymphoid tissue remodeling during a viral infection is orchestrated by a B cell-lymphotoxin-dependent pathway, *Blood*. **115**, 4725-33.
31. Lochner, M., Ohnmacht, C., Presley, L., Bruhns, P., Si-Tahar, M., Sawa, S. & Eberl, G. (2011) Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of RORgamma t and LTi cells, *The Journal of experimental medicine*. **208**, 125-34.
32. Luther, S. A., Lopez, T., Bai, W., Hanahan, D. & Cyster, J. G. (2000) BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis, *Immunity*. **12**, 471-81.
33. Neyt, K., Perros, F., GeurtsvanKessel, C. H., Hammad, H. & Lambrecht, B. N. (2012) Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity, *Trends in immunology*. **33**, 297-305.
34. Menard, L. C., Minns, L. A., Darche, S., Mielcarz, D. W., Foureau, D. M., Roos, D., Dzierszinski, F., Kasper, L. H. & Buzoni-Gatel, D. (2007) B cells amplify IFN-gamma production by T cells via a TNF-alpha-mediated mechanism, *Journal of immunology*. **179**, 4857-66.
35. Harris, D. P., Haynes, L., Sayles, P. C., Duso, D. K., Eaton, S. M., Lepak, N. M., Johnson, L. L., Swain, S. L. & Lund, F. E. (2000) Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells, *Nature immunology*. **1**, 475-82.
36. Bao, Y., Liu, X., Han, C., Xu, S., Xie, B., Zhang, Q., Gu, Y., Hou, J., Qian, L., Qian, C., Han, H. & Cao, X. (2014) Identification of IFN-gamma-producing innate B cells, *Cell research*. **24**, 161-76.
37. Gjertsson, I., Foster, S. & Tarkowski, A. (2003) Polarization of cytokine responses in B- and T-lymphocytes during *Staphylococcus aureus* infection, *Microbial pathogenesis*. **35**, 119-24.
38. Ganapamo, F., Dennis, V. A. & Philipp, M. T. (2001) CD19(+) cells produce IFN-gamma in mice infected with *Borrelia burgdorferi*, *European journal of immunology*. **31**, 3460-8.

39. Hobbs, M. V., McEvilly, R. J., Koch, R. J., Cardenas, G. J. & Noonan, D. J. (1991) Interleukin-6 production by murine B cells and B cell lines, *Cellular immunology*. **132**, 442-50.
40. Arkatkar, T., Du, S. W., Jacobs, H. M., Dam, E. M., Hou, B., Buckner, J. H., Rawlings, D. J. & Jackson, S. W. (2017) B cell-derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity, *The Journal of experimental medicine*. **214**, 3207-3217.
41. Lampropoulou, V., Hoehlig, K., Roch, T., Neves, P., Calderon Gomez, E., Sweenie, C. H., Hao, Y., Freitas, A. A., Steinhoff, U., Anderton, S. M. & Fillatreau, S. (2008) TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity, *Journal of immunology*. **180**, 4763-73.
42. Karnowski, A., Chevrier, S., Belz, G. T., Mount, A., Emslie, D., D'Costa, K., Tarlinton, D. M., Kallies, A. & Corcoran, L. M. (2012) B and T cells collaborate in antiviral responses via IL-6, IL-21, and transcriptional activator and coactivator, Oct2 and OBF-1, *The Journal of experimental medicine*. **209**, 2049-64.
43. Barr, T. A., Shen, P., Brown, S., Lampropoulou, V., Roch, T., Lawrie, S., Fan, B., O'Connor, R. A., Anderton, S. M., Bar-Or, A., Fillatreau, S. & Gray, D. (2012) B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells, *The Journal of experimental medicine*. **209**, 1001-10.
44. Molnarfi, N., Schulze-Topphoff, U., Weber, M. S., Patarroyo, J. C., Prod'homme, T., Varrin-Doyer, M., Shetty, A., Linington, C., Slavin, A. J., Hidalgo, J., Jenne, D. E., Wekerle, H., Sobel, R. A., Bernard, C. C., Shlomchik, M. J. & Zamvil, S. S. (2013) MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies, *The Journal of experimental medicine*. **210**, 2921-37.
45. Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L. & Kuchroo, V. K. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells, *Nature*. **441**, 235-8.
46. Leon, B., Ballesteros-Tato, A., Browning, J. L., Dunn, R., Randall, T. D. & Lund, F. E. (2012) Regulation of T(H)2 development by CXCR5+ dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells, *Nature immunology*. **13**, 681-90.
47. Wojciechowski, W., Harris, D. P., Sprague, F., Mousseau, B., Makris, M., Kusser, K., Honjo, T., Mohrs, K., Mohrs, M., Randall, T. & Lund, F. E. (2009) Cytokine-producing effector B cells regulate type 2 immunity to *H. polygyrus*, *Immunity*. **30**, 421-33.
48. Liu, Z., Liu, Q., Pesce, J., Anthony, R. M., Lamb, E., Whitmire, J., Hamed, H., Morimoto, M., Urban, J. F., Jr. & Gause, W. C. (2004) Requirements for the development of IL-4-producing T cells during intestinal nematode infections: what it takes to make a Th2 cell in vivo, *Immunological reviews*. **201**, 57-74.
49. Urban, J. F., Jr., Katona, I. M., Paul, W. E. & Finkelman, F. D. (1991) Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **88**, 5513-7.
50. Gorosito Serran, M., Fiocca Vernengo, F., Beccaria, C. G., Acosta Rodriguez, E. V., Montes, C. L. & Gruppi, A. (2015) The regulatory role of B cells in autoimmunity, infections and cancer: Perspectives beyond IL10 production, *FEBS letters*. **589**, 3362-9.
51. Katz, S. I., Parker, D. & Turk, J. L. (1974) B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions, *Nature*. **251**, 550-1.
52. Mizoguchi, A. & Bhan, A. K. (2006) A case for regulatory B cells, *Journal of immunology*. **176**, 705-10.
53. Bouaziz, J. D., Yanaba, K. & Tedder, T. F. (2008) Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation, *Immunological reviews*. **224**, 201-14.
54. Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S. & Bhan, A. K. (2002) Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation, *Immunity*. **16**, 219-30.
55. Bhan, A. K., Mizoguchi, E., Smith, R. N. & Mizoguchi, A. (2000) Spontaneous chronic colitis in TCR alpha-mutant mice; an experimental model of human ulcerative colitis, *International reviews of immunology*. **19**, 123-38.

56. Suzuki, A., Hanada, T., Mitsuyama, K., Yoshida, T., Kamizono, S., Hoshino, T., Kubo, M., Yamashita, A., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S., Matsumoto, S., Toyonaga, A., Sata, M. & Yoshimura, A. (2001) CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation, *The Journal of experimental medicine*. **193**, 471-81.
57. van der Vlugt, L. E., Labuda, L. A., Ozir-Fazalalikhani, A., Lievers, E., Gloudemans, A. K., Liu, K. Y., Barr, T. A., Sparwasser, T., Boon, L., Ngoa, U. A., Feugap, E. N., Adegnik, A. A., Kremsner, P. G., Gray, D., Yazdanbakhsh, M. & Smits, H. H. (2012) Schistosomes induce regulatory features in human and mouse CD1d(hi) B cells: inhibition of allergic inflammation by IL-10 and regulatory T cells, *PLoS one*. **7**, e30883.
58. Amu, S., Saunders, S. P., Kronenberg, M., Mangan, N. E., Atzberger, A. & Fallon, P. G. (2010) Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model, *The Journal of allergy and clinical immunology*. **125**, 1114-1124 e8.
59. Fillatreau, S., Sweeney, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. & Anderton, S. M. (2002) B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10, *Nature immunology*. **3**, 944-50.
60. Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R. A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang, V. D., Jaimes, Y., Daridon, C., Li, R., Jouneau, L., Boudinot, P., Wilantri, S., Sakwa, I., Miyazaki, Y., Leech, M. D., McPherson, R. C., Wirtz, S., Neurath, M., Hoehlig, K., Meinel, E., Grutzkau, A., Grun, J. R., Horn, K., Kuhl, A. A., Dorner, T., Bar-Or, A., Kaufmann, S. H. E., Anderton, S. M. & Fillatreau, S. (2014) IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases, *Nature*. **507**, 366-370.
61. Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Fujimoto, M. & Tedder, T. F. (2008) Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression, *The Journal of clinical investigation*. **118**, 3420-30.
62. Lampropoulou, V., Calderon-Gomez, E., Roch, T., Neves, P., Shen, P., Stervbo, U., Boudinot, P., Anderton, S. M. & Fillatreau, S. (2010) Suppressive functions of activated B cells in autoimmune diseases reveal the dual roles of Toll-like receptors in immunity, *Immunological reviews*. **233**, 146-61.
63. Scapini, P., Lamagna, C., Hu, Y., Lee, K., Tang, Q., DeFranco, A. L. & Lowell, C. A. (2011) B cell-derived IL-10 suppresses inflammatory disease in Lyn-deficient mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **108**, E823-32.
64. Teichmann, L. L., Kashgarian, M., Weaver, C. T., Roers, A., Muller, W. & Shlomchik, M. J. (2012) B cell-derived IL-10 does not regulate spontaneous systemic autoimmunity in MRL.Fas(lpr) mice, *Journal of immunology*. **188**, 678-85.
65. Blair, P. A., Chavez-Rueda, K. A., Evans, J. G., Shlomchik, M. J., Eddaoudi, A., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R. & Mauri, C. (2009) Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice, *Journal of immunology*. **182**, 3492-3502.
66. Blair, P. A., Norena, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R. & Mauri, C. (2010) CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients, *Immunity*. **32**, 129-40.
67. Neves, P., Lampropoulou, V., Calderon-Gomez, E., Roch, T., Stervbo, U., Shen, P., Kuhl, A. A., Loddenkemper, C., Haury, M., Nedospasov, S. A., Kaufmann, S. H., Steinhoff, U., Calado, D. P. & Fillatreau, S. (2010) Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during Salmonella typhimurium infection, *Immunity*. **33**, 777-90.
68. Lee, C. C. & Kung, J. T. (2012) Marginal zone B cell is a major source of IL-10 in Listeria monocytogenes susceptibility, *Journal of immunology*. **189**, 3319-27.
69. Sathish, J. G., Sethu, S., Bielsky, M. C., de Haan, L., French, N. S., Govindappa, K., Green, J., Griffiths, C. E., Holgate, S., Jones, D., Kimber, I., Moggs, J., Naisbitt, D. J., Pirmohamed, M., Reichmann, G., Sims, J., Subramanyam, M., Todd, M. D., Van Der Laan, J. W., Weaver, R. J. &

- Park, B. K. (2013) Challenges and approaches for the development of safer immunomodulatory biologics, *Nature reviews Drug discovery*. **12**, 306-24.
70. Grillo-Lopez, A. J. (2000) Rituximab: an insider's historical perspective, *Seminars in oncology*. **27**, 9-16.
71. Tandan, R., Hehir, M. K., 2nd, Waheed, W. & Howard, D. B. (2017) Rituximab treatment of myasthenia gravis: A systematic review, *Muscle & nerve*. **56**, 185-196.
72. Schioppo, T. & Ingegnoli, F. (2017) Current perspective on rituximab in rheumatic diseases, *Drug design, development and therapy*. **11**, 2891-2904.
73. Joly, P., Mouquet, H., Roujeau, J. C., D'Incan, M., Gilbert, D., Jacquot, S., Gougeon, M. L., Bedane, C., Muller, R., Dreno, B., Doutre, M. S., Delaporte, E., Pauwels, C., Franck, N., Caux, F., Picard, C., Tancrede-Bohin, E., Bernard, P., Tron, F., Hertl, M. & Musette, P. (2007) A single cycle of rituximab for the treatment of severe pemphigus, *The New England journal of medicine*. **357**, 545-52.
74. Marshall, M. J. E., Stopforth, R. J. & Cragg, M. S. (2017) Therapeutic Antibodies: What Have We Learnt from Targeting CD20 and Where Are We Going?, *Frontiers in immunology*. **8**, 1245.
75. Montalvao, F., Garcia, Z., Celli, S., Breart, B., Deguine, J., Van Rooijen, N. & Bousso, P. (2013) The mechanism of anti-CD20-mediated B cell depletion revealed by intravital imaging, *The Journal of clinical investigation*. **123**, 5098-103.
76. DiLillo, D. J., Hamaguchi, Y., Ueda, Y., Yang, K., Uchida, J., Haas, K. M., Kelsoe, G. & Tedder, T. F. (2008) Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice, *Journal of immunology*. **180**, 361-71.
77. Melet, J., Mulleman, D., Goupille, P., Ribourtout, B., Watier, H. & Thibault, G. (2013) Rituximab-induced T cell depletion in patients with rheumatoid arthritis: association with clinical response, *Arthritis and rheumatism*. **65**, 2783-90.
78. Diaz-Torné, C., M. A. O., C Zamora, H. C., E. P.-R., A. M. L., J. L., C. G., C. J., C. D. & S. V. (2010) The effect of Rituximab treatment on T cells, *Journal of translational medicine*. **8**, 66.
79. Masiak, A. & Zdrojewski, Z. (2017) Relapsing granulomatosis with polyangiitis with severe lung and upper respiratory tract involvement successfully treated with rituximab, *Reumatologia*. **55**, 208-212.
80. Cross, A. H., Stark, J. L., Lauber, J., Ramsbottom, M. J. & Lyons, J. A. (2006) Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients, *Journal of neuroimmunology*. **180**, 63-70.
81. Aksoy, S., Harputluoglu, H., Kilickap, S., Dede, D. S., Dizdar, O., Altundag, K. & Barista, I. (2007) Rituximab-related viral infections in lymphoma patients, *Leukemia & lymphoma*. **48**, 1307-12.
82. Cohen, S. B., Emery, P., Greenwald, M. W., Dougados, M., Furie, R. A., Genovese, M. C., Keystone, E. C., Loveless, J. E., Burmester, G. R., Cravets, M. W., Hessey, E. W., Shaw, T., Totoritis, M. C. & Group, R. T. (2006) Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks, *Arthritis and rheumatism*. **54**, 2793-806.
83. Trivin, C., Tran, A., Moulin, B., Choukroun, G., Gatault, P., Courivaud, C., Augusto, J. F., Ficheux, M., Vigneau, C., Thervet, E. & Karras, A. (2017) Infectious complications of a rituximab-based immunosuppressive regimen in patients with glomerular disease, *Clinical kidney journal*. **10**, 461-469.
84. Fillatreau, S., Gray, D. & Anderton, S. M. (2008) Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology, *Nature reviews Immunology*. **8**, 391-7.
85. Bermejo, D. A., Jackson, S. W., Gorosito-Serran, M., Acosta-Rodriguez, E. V., Amezcua-Vesely, M. C., Sather, B. D., Singh, A. K., Khim, S., Mucci, J., Liggitt, D., Campetella, O., Oukka, M., Gruppi, A. & Rawlings, D. J. (2013) Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program

independent of the transcription factors ROR γ and AhR that leads to IL-17 production by activated B cells, *Nature immunology*. **14**, 514-22.

86. Amezcua Vesely, M. C., Bermejo, D. A., Montes, C. L., Acosta-Rodriguez, E. V. & Gruppi, A. (2012) B-Cell Response during Protozoan Parasite Infections, *Journal of parasitology research*. **2012**, 362131.

87. Chagas, C. (1909) Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem, *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **1**.

88. Coura, J. R. & Vinas, P. A. (2010) Chagas disease: a new worldwide challenge, *Nature*. **465**, S6-7.

89. (2015) Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates, *Releve epidemiologique hebdomadaire*. **90**, 33-43.

90. Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M. J. & Montgomery, S. P. (2011) Trypanosoma cruzi and Chagas' Disease in the United States, *Clinical microbiology reviews*. **24**, 655-81.

91. Basile, L., Jansa, J. M., Carlier, Y., Salamanca, D. D., Angheben, A., Bartoloni, A., Seixas, J., Van Gool, T., Canavate, C., Flores-Chavez, M., Jackson, Y., Chiodini, P. L., Albajar-Vinas, P. & Working Group on Chagas, D. (2011) Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system, *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. **16**.

92. N Klein, I. H., R Durvasula (2012) Globalization of Chagas Disease: A Growing Concern in Nonendemic Countries, *Epidemiology Research International*. **2012**.

93. Bermejo, D. A., Amezcua Vesely, M. C., Khan, M., Acosta Rodriguez, E. V., Montes, C. L., Merino, M. C., Toellner, K. M., Mohr, E., Taylor, D., Cunningham, A. F. & Gruppi, A. (2011) Trypanosoma cruzi infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies, *Immunology*. **132**, 123-33.

94. Bonney, K. M. & Engman, D. M. (2015) Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead, *The American journal of pathology*. **185**, 1537-47.

95. Jin, W. & Dong, C. (2013) IL-17 cytokines in immunity and inflammation, *Emerging microbes & infections*. **2**, e60.

96. Tosello Boari, J., Amezcua Vesely, M. C., Bermejo, D. A., Ramello, M. C., Montes, C. L., Cejas, H., Gruppi, A. & Acosta Rodriguez, E. V. (2012) IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during Trypanosoma cruzi infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils, *PLoS pathogens*. **8**, e1002658.

97. Miyazaki, Y., Hamano, S., Wang, S., Shimano, Y., Iwakura, Y. & Yoshida, H. (2010) IL-17 is necessary for host protection against acute-phase Trypanosoma cruzi infection, *Journal of immunology*. **185**, 1150-7.

98. da Matta Guedes, P. M., Gutierrez, F. R., Maia, F. L., Milanezi, C. M., Silva, G. K., Pavanelli, W. R. & Silva, J. S. (2010) IL-17 produced during Trypanosoma cruzi infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis, *PLoS neglected tropical diseases*. **4**, e604.

99. Cardillo, F., Postol, E., Nihei, J., Aroeira, L. S., Nomizo, A. & Mengel, J. (2007) B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection, *Immunology*. **122**, 584-95.

100. Gorosito Serran, M., Tosello Boari, J., Fiocca Vernengo, F., Beccaria, C. G., Ramello, M. C., Bermejo, D. A., Cook, A. G., Vinuesa, C. G., Montes, C. L., Acosta Rodriguez, E. V. & Gruppi, A. (2017) Unconventional Pro-inflammatory CD4(+) T Cell Response in B Cell-Deficient Mice Infected with Trypanosoma cruzi, *Frontiers in immunology*. **8**, 1548.

101. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations (*), *Annual review of immunology*. **28**, 445-89.

102. Junqueira, C., Caetano, B., Bartholomeu, D. C., Melo, M. B., Ropert, C., Rodrigues, M. M. & Gazzinelli, R. T. (2010) The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease, *Expert reviews in molecular medicine*. **12**, e29.

103. Tarleton, R. L. (2007) Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*, *Current opinion in immunology*. **19**, 430-4.
104. Boscardin, S. B., Torrecilhas, A. C., Manarin, R., Revelli, S., Rey, E. G., Tonelli, R. R. & Silber, A. M. (2010) Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies, *Journal of cellular and molecular medicine*. **14**, 1373-84.
105. Tarleton, R. L., Grusby, M. J. & Zhang, L. (2000) Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*, *Journal of immunology*. **165**, 1520-5.
106. Holscher, C., Kohler, G., Muller, U., Mossmann, H., Schaub, G. A. & Brombacher, F. (1998) Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase, *Infection and immunity*. **66**, 1208-15.
107. Masopust, D., Vezys, V., Wherry, E. J. & Ahmed, R. (2007) A brief history of CD8 T cells, *European journal of immunology*. **37 Suppl 1**, S103-10.
108. Rodrigues, M. M., Alencar, B. C., Claser, C. & Tzelepis, F. (2009) Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease?, *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. **42**, 220-3.
109. Tschärke, D. C., Croft, N. P., Doherty, P. C. & La Gruta, N. L. (2015) Sizing up the key determinants of the CD8(+) T cell response, *Nature reviews Immunology*. **15**, 705-16.
110. Kurtulus, S., Tripathi, P. & Hildeman, D. A. (2012) Protecting and rescuing the effectors: roles of differentiation and survival in the control of memory T cell development, *Frontiers in immunology*. **3**, 404.
111. Kaech, S. M. & Wherry, E. J. (2007) Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection, *Immunity*. **27**, 393-405.
112. Zhang, N. & Bevan, M. J. (2011) CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system, *Immunity*. **35**, 161-8.
113. Betts, M. R., Nason, M. C., West, S. M., De Rosa, S. C., Migueles, S. A., Abraham, J., Lederman, M. M., Benito, J. M., Goepfert, P. A., Connors, M., Roederer, M. & Koup, R. A. (2006) HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells, *Blood*. **107**, 4781-9.
114. de la Roche, M., Asano, Y. & Griffiths, G. M. (2016) Origins of the cytolytic synapse, *Nature reviews Immunology*. **16**, 421-32.
115. Wherry, E. J. & Kurachi, M. (2015) Molecular and cellular insights into T cell exhaustion, *Nature reviews Immunology*. **15**, 486-99.
116. Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., van der Most, R. & Ahmed, R. (2003) Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment, *Journal of virology*. **77**, 4911-27.
117. Bucks, C. M., Norton, J. A., Boesteanu, A. C., Mueller, Y. M. & Katsikis, P. D. (2009) Chronic antigen stimulation alone is sufficient to drive CD8+ T cell exhaustion, *Journal of immunology*. **182**, 6697-708.
118. Streeck, H., Brumme, Z. L., Anastario, M., Cohen, K. W., Jolin, J. S., Meier, A., Brumme, C. J., Rosenberg, E. S., Alter, G., Allen, T. M., Walker, B. D. & Altfeld, M. (2008) Antigen load and viral sequence diversification determine the functional profile of HIV-1-specific CD8+ T cells, *PLoS medicine*. **5**, e100.
119. Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., Betts, M. R., Freeman, G. J., Vignali, D. A. & Wherry, E. J. (2009) Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection, *Nature immunology*. **10**, 29-37.
120. Brooks, D. G., McGavern, D. B. & Oldstone, M. B. (2006) Reprogramming of antiviral T cells prevents inactivation and restores T cell activity during persistent viral infection, *The Journal of clinical investigation*. **116**, 1675-85.

121. Jin, H. T., Anderson, A. C., Tan, W. G., West, E. E., Ha, S. J., Araki, K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K. & Ahmed, R. (2010) Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**, 14733-8.
122. Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J. M., Blazar, B. R., Kuchroo, V. K. & Anderson, A. C. (2010) Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity, *The Journal of experimental medicine*. **207**, 2187-94.
123. Tarleton, R. L. (2015) CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection, *Seminars in immunopathology*. **37**, 233-8.
124. Tarleton, R. L., Sun, J., Zhang, L. & Postan, M. (1994) Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease, *Infection and immunity*. **62**, 1820-9.
125. Cox, M. A., Kahan, S. M. & Zajac, A. J. (2013) Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love, *Virology*. **435**, 157-69.
126. Tarleton, R. L. (1990) Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*, *Journal of immunology*. **144**, 717-24.
127. Tarleton, R. L., Koller, B. H., Latour, A. & Postan, M. (1992) Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection, *Nature*. **356**, 338-40.
128. Garg, N., Nunes, M. P. & Tarleton, R. L. (1997) Delivery by *Trypanosoma cruzi* of proteins into the MHC class I antigen processing and presentation pathway, *Journal of immunology*. **158**, 3293-302.
129. Wize, B., Nunes, M. & Tarleton, R. L. (1997) Identification of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family members as targets of protective CD8+ TC1 responses, *Journal of immunology*. **159**, 6120-30.
130. Low, H. P., Santos, M. A., Wize, B. & Tarleton, R. L. (1998) Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8+ CTL, *Journal of immunology*. **160**, 1817-23.
131. El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D. A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J. F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P. T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A. C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M. J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C. R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J. C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J. L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S. L., Sanchez, D. O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A. J., Sisk, E., Tammi, M. T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P. N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C. M., Stuart, K. D. & Andersson, B. (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, *Science*. **309**, 409-15.
132. Atwood, J. A., 3rd, Weatherly, D. B., Minning, T. A., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F. R., Orlando, R. & Tarleton, R. L. (2005) The *Trypanosoma cruzi* proteome, *Science*. **309**, 473-6.
133. Martin, D. L., Weatherly, D. B., Laucella, S. A., Cabinian, M. A., Crim, M. T., Sullivan, S., Heiges, M., Craven, S. H., Rosenberg, C. S., Collins, M. H., Sette, A., Postan, M. & Tarleton, R. L. (2006) CD8+ T-Cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes, *PLoS pathogens*. **2**, e77.
134. Alvarez, M. G., Postan, M., Weatherly, D. B., Albareda, M. C., Sidney, J., Sette, A., Olivera, C., Armenti, A. H., Tarleton, R. L. & Laucella, S. A. (2008) HLA Class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8+ T cells in chronic Chagas disease, *PLoS neglected tropical diseases*. **2**, e288.
135. Freitas, L. M., dos Santos, S. L., Rodrigues-Luiz, G. F., Mendes, T. A., Rodrigues, T. S., Gazzinelli, R. T., Teixeira, S. M., Fujiwara, R. T. & Bartholomeu, D. C. (2011) Genomic analyses,

gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity, *PLoS one*. **6**, e25914.

136. Kurup, S. P. & Tarleton, R. L. (2014) The *Trypanosoma cruzi* flagellum is discarded via asymmetric cell division following invasion and provides early targets for protective CD8(+) T cells, *Cell host & microbe*. **16**, 439-49.

137. Gutierrez, F. R., Mariano, F. S., Oliveira, C. J., Pavanelli, W. R., Guedes, P. M., Silva, G. K., Campanelli, A. P., Milanezi, C. M., Azuma, M., Honjo, T., Teixeira, M. M., Aliberti, J. C. & Silva, J. S. (2011) Regulation of *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis by programmed death cell receptor 1, *Infection and immunity*. **79**, 1873-81.

138. Sullivan, N. L., Eickhoff, C. S., Sagartz, J. & Hoft, D. F. (2015) Deficiency of antigen-specific B cells results in decreased *Trypanosoma cruzi* systemic but not mucosal immunity due to CD8 T cell exhaustion, *Journal of immunology*. **194**, 1806-18.

139. Albareda, M. C., Olivera, G. C., Laucella, S. A., Alvarez, M. G., Fernandez, E. R., Lococo, B., Viotti, R., Tarleton, R. L. & Postan, M. (2009) Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4+ T cells to immune senescence, *Journal of immunology*. **183**, 4103-8.

140. Arguello, R. J., Vigliano, C., Cabeza-Meckert, P., Viotti, R., Garelli, F., Favalaro, L. E., Favalaro, R. R., Laguens, R. & Laucella, S. A. (2014) 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.

141. Albareda, M. C., De Rissio, A. M., Tomas, G., Serjan, A., Alvarez, M. G., Viotti, R., Fichera, L. E., Esteva, M. I., Potente, D., Armenti, A., Tarleton, R. L. & Laucella, S. A. (2013) Polyfunctional T cell responses in children in early stages of chronic *Trypanosoma cruzi* infection contrast with monofunctional responses of long-term infected adults, *PLoS neglected tropical diseases*. **7**, e2575.

142. Rosenberg, C. S., Martin, D. L. & Tarleton, R. L. (2010) CD8+ T cells specific for immunodominant trans-sialidase epitopes contribute to control of *Trypanosoma cruzi* infection but are not required for resistance, *Journal of immunology*. **185**, 560-8.

143. Lyon, M. F. S., A. G (1989) Genetic variants and strains of the laboratory mouse, *Oxford University Press*. **2nd Edition**.

144. Garcia, G. A., Arnaiz, M. R., Laucella, S. A., Esteva, M. I., Ainciart, N., Riarte, A., Garavaglia, P. A., Fichera, L. E. & Ruiz, A. M. (2006) Immunological and pathological responses in BALB/c mice induced by genetic administration of Tc 13 Tul antigen of *Trypanosoma cruzi*, *Parasitology*. **132**, 855-66.

145. Holscher, C., Mohrs, M., Dai, W. J., Kohler, G., Ryffel, B., Schaub, G. A., Mossmann, H. & Brombacher, F. (2000) Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice, *Infection and immunity*. **68**, 4075-83.

146. Muller, U., Sobek, V., Balkow, S., Holscher, C., Mullbacher, A., Museteanu, C., Mossmann, H. & Simon, M. M. (2003) Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway, *European journal of immunology*. **33**, 70-8.

147. Ronco, M. T., Frances, D. E., Ingaramo, P. I., Quiroga, A. D., Alvarez, M. L., Pisani, G. B., Revelli, S. S. & Carnovale, C. E. (2010) Tumor necrosis factor alpha induced by *Trypanosoma cruzi* infection mediates inflammation and cell death in the liver of infected mice, *Cytokine*. **49**, 64-72.

148. Harty, J. T. & Badovinac, V. P. (2008) Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory, *Nature reviews Immunology*. **8**, 107-19.

149. Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C. & Lefrancois, L. (2000) Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo, *Nature immunology*. **1**, 426-32.

150. Kaech, S. M., Tan, J. T., Wherry, E. J., Konieczny, B. T., Surh, C. D. & Ahmed, R. (2003) Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells, *Nature immunology*. **4**, 1191-8.

151. Joshi, N. S., Cui, W., Chandele, A., Lee, H. K., Urso, D. R., Hagman, J., Gapin, L. & Kaech, S. M. (2007) Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor, *Immunity*. **27**, 281-95.
152. Sarkar, S., Kalia, V., Haining, W. N., Konieczny, B. T., Subramaniam, S. & Ahmed, R. (2008) Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates, *The Journal of experimental medicine*. **205**, 625-40.
153. San Jose, E., Borroto, A., Niedergang, F., Alcover, A. & Alarcon, B. (2000) Triggering the TCR complex causes the downregulation of nonengaged receptors by a signal transduction-dependent mechanism, *Immunity*. **12**, 161-70.
154. Van Seventer, G. A., Shimizu, Y., Horgan, K. J. & Shaw, S. (1990) The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells, *Journal of immunology*. **144**, 4579-86.
155. Fuertes Marraco, S. A., Neubert, N. J., Verdeil, G. & Speiser, D. E. (2015) Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion, *Frontiers in immunology*. **6**, 310.
156. Lazarevic, V., Glimcher, L. H. & Lord, G. M. (2013) T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity, *Nature reviews Immunology*. **13**, 777-89.
157. Tosello-Boari, J. (2015) *Tesis de Doctorado: Estudio de los mecanismos protectores mediados por citoquinas de la familia de interleuquina 17 durante la infección con Trypanosoma cruzi*, Universidad Nacional de Córdoba, Departamento de Bioquímica Clínica - Facultad de Ciencias Químicas.
158. Cooper, M. D., Peterson, R. D. & Good, R. A. (1965) Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken, *Nature*. **205**, 143-6.
159. Elsegeiny, W., Eddens, T., Chen, K. & Kolls, J. K. (2015) Anti-CD20 antibody therapy and susceptibility to Pneumocystis pneumonia, *Infection and immunity*. **83**, 2043-52.
160. Sarikonda, G., Sachithanatham, S., Manenkova, Y., Kupfer, T., Posgai, A., Wasserfall, C., Bernstein, P., Straub, L., Pagni, P. P., Schneider, D., Calvo, T. R., Coulombe, M., Herold, K., Gill, R. G., Atkinson, M., Nepom, G., Ehlers, M., Staeva, T., Garren, H., Steinman, L., Chan, A. C. & von Herrath, M. (2013) Transient B-cell depletion with anti-CD20 in combination with proinsulin DNA vaccine or oral insulin: immunologic effects and efficacy in NOD mice, *PLoS one*. **8**, e54712.
161. Zuniga, E., Motran, C., Montes, C. L., Diaz, F. L., Bocco, J. L. & Gruppi, A. (2000) Trypanosoma cruzi-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrests their proliferation during acute infection, *Clinical and experimental immunology*. **119**, 507-15.
162. Zuniga, E., Acosta-Rodriguez, E., Merino, M. C., Montes, C. & Gruppi, A. (2005) Depletion of immature B cells during Trypanosoma cruzi infection: involvement of myeloid cells and the cyclooxygenase pathway, *European journal of immunology*. **35**, 1849-58.
163. Zuniga, E., Motran, C. C., Montes, C. L., Yagita, H. & Gruppi, A. (2002) Trypanosoma cruzi infection selectively renders parasite-specific IgG+ B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide, *Journal of immunology*. **168**, 3965-73.
164. Kumar, S. & Tarleton, R. L. (1998) The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of Trypanosoma cruzi, *Parasite immunology*. **20**, 207-16.
165. Cardoso, M. S., Reis-Cunha, J. L. & Bartholomeu, D. C. (2015) Evasion of the Immune Response by Trypanosoma cruzi during Acute Infection, *Frontiers in immunology*. **6**, 659.
166. Bryan, M. A., Guyach, S. E. & Norris, K. A. (2010) Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in Trypanosoma cruzi infection of susceptible and resistant mice, *PLoS neglected tropical diseases*. **4**, e733.
167. Perez-Molina, J. A. & Molina, I. (2018) Chagas disease, *Lancet*. **391**, 82-94.
168. Tarleton, R. L. (2001) Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease, *International journal for parasitology*. **31**, 550-4.

169. Badovinac, V. P., Porter, B. B. & Harty, J. T. (2004) CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation, *Nature immunology*. **5**, 809-17.
170. Bixby, L. M. & Tarleton, R. L. (2008) Stable CD8+ T cell memory during persistent *Trypanosoma cruzi* infection, *Journal of immunology*. **181**, 2644-50.
171. Hou, S., Hyland, L., Ryan, K. W., Portner, A. & Doherty, P. C. (1994) Virus-specific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size, *Nature*. **369**, 652-4.
172. Murali-Krishna, K., Altman, J. D., Suresh, M., Sourdive, D. J., Zajac, A. J., Miller, J. D., Slansky, J. & Ahmed, R. (1998) Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection, *Immunity*. **8**, 177-87.
173. Voehringer, D., Blaser, C., Brawand, P., Raulet, D. H., Hanke, T. & Pircher, H. (2001) Viral infections induce abundant numbers of senescent CD8 T cells, *Journal of immunology*. **167**, 4838-43.
174. Hoft, D. F. & Eickhoff, C. S. (2005) Type 1 immunity provides both optimal mucosal and systemic protection against a mucosally invasive, intracellular pathogen, *Infection and immunity*. **73**, 4934-40.
175. Barber, D. L., Wherry, E. J. & Ahmed, R. (2003) Cutting edge: rapid in vivo killing by memory CD8 T cells, *Journal of immunology*. **171**, 27-31.
176. Marino, E., Tan, B., Binge, L., Mackay, C. R. & Grey, S. T. (2012) B-cell cross-presentation of autologous antigen precipitates diabetes, *Diabetes*. **61**, 2893-905.
177. Martin, D. L., Murali-Krishna, K. & Tarleton, R. L. (2010) Generation of *Trypanosoma cruzi*-specific CD8+ T-cell immunity is unaffected by the absence of type I interferon signaling, *Infection and immunity*. **78**, 3154-9.
178. Gao, W. & Pereira, M. A. (2002) Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*, *International journal for parasitology*. **32**, 167-70.
179. Sanmarco, L. M., Visconti, L. M., Eberhardt, N., Ramello, M. C., Ponce, N. E., Spitale, N. B., Voza, M. L., Bernardi, G. A., Gea, S., Minguez, A. R. & Aoki, M. P. (2016) IL-6 Improves the Nitric Oxide-Induced Cytotoxic CD8+ T Cell Dysfunction in Human Chagas Disease, *Frontiers in immunology*. **7**, 626.
180. Perdomo-Celis, F., Taborda, N. A. & Rugeles, M. T. (2017) Follicular CD8(+) T Cells: Origin, Function and Importance during HIV Infection, *Frontiers in immunology*. **8**, 1241.
181. Erdmann, H., Rosznagel, C., Bohme, J., Iwakura, Y., Jacobs, T., Schaible, U. E. & Holscher, C. (2013) IL-17A promotes macrophage effector mechanisms against *Trypanosoma cruzi* by trapping parasites in the endolysosomal compartment, *Immunobiology*. **218**, 910-23.
182. Hua, Q., Zhu, Y. & Liu, H. (2015) Severe and fatal adverse events risk associated with rituximab addition to B-cell non-Hodgkin's lymphoma (B-NHL) chemotherapy: a meta-analysis, *Journal of chemotherapy*. **27**, 365-70.
183. Edwards, J. C., Leandro, M. J. & Cambridge, G. (2004) B lymphocyte depletion therapy with rituximab in rheumatoid arthritis, *Rheumatic diseases clinics of North America*. **30**, 393-403, viii.
184. van Oers, M. H., Klasa, R., Marcus, R. E., Wolf, M., Kimby, E., Gascoyne, R. D., Jack, A., Van't Veer, M., Vranovsky, A., Holte, H., van Glabbeke, M., Teodorovic, I., Rozewicz, C. & Hagenbeek, A. (2006) Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction: results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial, *Blood*. **108**, 3295-301.
185. Saadoun, D., Rosenzweig, M., Landau, D., Piette, J. C., Klatzmann, D. & Cacoub, P. (2008) Restoration of peripheral immune homeostasis after rituximab in mixed cryoglobulinemia vasculitis, *Blood*. **111**, 5334-41.
186. Emmanuel, B., Sidique, N., Zhang, X., Poonia, B., Sneller, M. C. & Kottlil, S. (2017) Decline of cellular activation in non-B cells after rituximab treatment in hepatitis C-associated mixed cryoglobulinemia vasculitis, *Journal of viral hepatitis*. **24**, 128-131.
187. Heim, M. H. (2003) A new survival trick of hepatitis C virus: blocking the activation of interferon regulatory factor-3, *Hepatology*. **38**, 1582-4.

188. Quinton, L. J., Blahna, M. T., Jones, M. R., Allen, E., Ferrari, J. D., Hilliard, K. L., Zhang, X., Sabharwal, V., Algul, H., Akira, S., Schmid, R. M., Pelton, S. I., Spira, A. & Mizgerd, J. P. (2012) Hepatocyte-specific mutation of both NF-kappaB RelA and STAT3 abrogates the acute phase response in mice, *The Journal of clinical investigation*. **122**, 1758-63.
189. Nilsberth, C., Elander, L., Hamzic, N., Norell, M., Lonn, J., Engstrom, L. & Blomqvist, A. (2009) The role of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced fever by mechanisms independent of prostaglandin E2, *Endocrinology*. **150**, 1850-60.
190. Meeks, K. D., Sieve, A. N., Kolls, J. K., Ghilardi, N. & Berg, R. E. (2009) IL-23 is required for protection against systemic infection with *Listeria monocytogenes*, *Journal of immunology*. **183**, 8026-34.
191. Witowski, J., Pawlaczyk, K., Breborowicz, A., Scheuren, A., Kuzlan-Pawlaczyk, M., Wisniewska, J., Polubinska, A., Friess, H., Gahl, G. M., Frei, U. & Jorres, A. (2000) IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells, *Journal of immunology*. **165**, 5814-21.
192. Yang, X. O., Chang, S. H., Park, H., Nurieva, R., Shah, B., Acero, L., Wang, Y. H., Schluns, K. S., Broaddus, R. R., Zhu, Z. & Dong, C. (2008) Regulation of inflammatory responses by IL-17F, *The Journal of experimental medicine*. **205**, 1063-75.
193. Kim, M. V., Ouyang, W., Liao, W., Zhang, M. Q. & Li, M. O. (2014) Murine in vivo CD8(+) T Cell Killing Assay, *Bio-protocol*. **4**.
194. Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., Lopez-Chejade, P., Puig, L., Verges, M., Gascon, J., Gomez i Prat, J., Portus, M. & Sauleda, S. (2007) Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples, *Acta tropica*. **103**, 195-200.