



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



**FCQ**  
Facultad  
Ciencias Químicas

Tesis de doctorado en Ciencias Químicas

# CONTRIBUCIÓN DE LA RESPUESTA DE CÉLULAS T REGULATORIAS EN LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN CON *TRYPANOSOMA CRUZI*

Lic. Cintia Liliana Araujo Furlan

*Departamento de Bioquímica Clínica - Facultad de Ciencias Químicas*

*Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología - CONICET*

*Universidad Nacional de Córdoba*

*Córdoba, Argentina*

*2018*



**Directora de tesis:**

Dra. Eva Acosta Rodríguez

**Comisión asesora de tesis:**

Dra. Virginia Rivero

Dra. Lilian Canavoso

Dra. María Carolina Touz

**Comisión evaluadora de tesis:**

Dra. Virginia Rivero

Dra. Lilian Canavoso

Dra. María Carolina Touz

Evaluador externo: Dr. Guillermo Docena (UNLP)



Este trabajo se realizó con el apoyo de las siguientes organizaciones nacionales e internacionales que contribuyeron en el financiamiento de diferentes proyectos del grupo de investigación: Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNC, CONICET, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Fundación Florencio Fiorini e Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos.



A Norma





## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es producto de un gran trabajo colectivo que tuvo muchos partícipes, cada uno aportando desde su lugar, en la mesada durante los arduos días de “experimento”, en ese oído prestado y esas cervezas compartidas para el desahogo cuando el vaso se ve medio vacío, o en esos consejos en el momento justo para motivarnos. Por eso, llegado este momento solo me queda agradecer a todos los que me acompañaron e hicieron posible mi tránsito por el CIBICI a lo largo de estos cinco años de tesis.

Gracias a la Eva. Desde aquella entrevista por Skype cuando estábamos separadas por varios km me convenciste de que Córdoba era mi próximo destino para habitar. Algunas dudas tenía yo, los que me conocen sabrán que a veces puedo ser muy indecisa. Pero todos sabemos cuán convincente sos Eva con tus argumentos, cuidados en cada detalle, así que gracias por elegirme, recibirme en tu grupo y confiar en mí aún sin conocerme personalmente. Gracias por estar siempre cerca, aportando consejos ante cualquier mínima duda teórica o experimental, motivándonos siempre a afrontar los desafíos y vencer las inseguridades. “¡El mundo es de los valientes!” te he escuchado decir más de una vez. Gracias por apoyarme siempre en cada decisión, que una pasantía en el exterior, que una beca para terminar el paper y darme tiempo a decidir cuál será la próxima ciudad a habitar.

Gracias a la Jime. Tanto tengo para agradecerte, que no sé ni por dónde empezar. Gracias por enseñarme todo!! Y con tanta paciencia. Gracias por la confianza. Gracias por todos los consejos científicos y personales. Gracias por las caminatas filosóficas desde la facu. Cuántas esquinas nos vieron demorar el saludo de despedida por Foucault, Derrida o Zizek. Gracias por ser el motor inspirador de tantos cambios internos.

Gracias a la Cotita y al Santi. Peques, son lo más!!! Admiro su predisposición a las largas jornadas de experimentos con mis cinéticas, y los constantes experimentos con los DREG, que son varios en uno. Gracias por ponerle tanta onda al laburo de cada día.

Gracias a todos los Gruma. Gracias Cris, Facu, Fer, Meli, Ceci R, Sabri, Lau, Carito, Adri, Caro, Fede y Ceci B. Trabajar con ustedes siempre es un placer. Gracias por enseñarme el valor y la fuerza del trabajo en equipo.

Gracias a todo el lab 103, en especial a los becarios con los que hacinados compartimos y renegamos de ese espacio reducido (y cómo lo vamos a extrañar cuando nos mudemos!!). Gracias Augusto, Lau, Xime, Yami, David, Coti, Fer, Lili, Nati, Agus, Eli, Luisi, Pato, Sabri, Colo y Nico por el compañerismo y la amistad. Porque me enseñaron que trabajar puede ser muy divertido y que el humor nunca debe faltar en tierras cordobesas.

Gracias a los amigos que encontré más allá del 103. Gracias Viqui, Clau, Javi, Emi y Rachel. Gracias por los consejos sobre arañas, becas, cervezas y viajes. Brindo porque los caminos nos reúnan en nuevos destinos y aventuras.

Gracias a todo el área de inmuno, porque la unidad hace a la fuerza. Gracias por las clases, cursos y congresos compartidos.

Gracias a todo el personal y técnicos CPA del Departamento de Bioquímica Clínica – CIBICI CONICET, que nos facilitan enormemente las tareas de todos los días. Gracias a los bioteristas Victoria Blanco, Fabricio Navarro, Diego Luti, Raúl Villareal, Carolina Florit, Walter Requena y Cecilia Noriega. Gracias a las encargadas del área de cultivo celular Alejandra Romero, Laura Gatica y Gabriela Furlán. Gracias a las técnicas del área de citometría de flujo Pilar Crespo y Paula Abadie. Y finalmente, gracias a los secretarios Cecilia Bertacchini, Adriana Berreta, Laura Santamaría y Martín Roberto.

Gracias a toda la comunidad del CIBICI por la construcción de un espacio de trabajo respetuoso y ameno, aportando ideas para el crecimiento conjunto de todas las áreas (y gracias por la organización de más de una fiesta del becario!!).

Gracias al grupo del CPTP de Toulouse por recibirme y enseñarme todo sobre secuenciaciones y bioinformática, y un poco más aún de francés. Merci Olivier, Véro, Joanna, Béné, Agathe et Cécile.

Gracias a la comisión de tesis, por el aporte de todas las reuniones y la buena predisposición para que llegue este momento, y gracias al Dr. Docena por aceptar ser evaluador externo.

Gracias a la Universidad pública y gratuita.

Gracias a los amigos de la facu y de la vida, Noe, Cintia, Bel, Lian, Kari, Ana Y., Ana P., Dai, Sol, Luis, Romi, Belu, Moni, Fer, Jorge, Guille, Jime, Pau, Pala, Richard y Mari. Gracias a todos por estar siempre cerca a pesar de las distancias.

Y finalmente, gracias a mi familia, mi pilar fundamental. Gracias ma por tu apoyo incondicional, por estar siempre del otro lado del celu para darme contención y consejos certeros cada vez que los necesité. Sin tu compañía a lo largo de estos cinco años el camino hubiera sido mucho más pedregoso. Gracias pa por tus consejos sinceros. Gracias Su por esos cuatro años de convivencia, que me hicieron repensar muchas cosas sobre mí. Gracias Sonia, Sergio y Sabri por estar juntos en los momentos más importantes.

Gracias!!



## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABREVIACIONES Y ACRÓNIMOS .....	3
INTRODUCCIÓN .....	7
Enfermedad de Chagas.....	9
Aproximación biomédica .....	9
Respuesta inmune frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	13
Células T regulatorias Foxp3 <sup>+</sup> .....	17
Características generales .....	17
Células T regulatorias en infecciones .....	24
Células T regulatorias en la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	25
Antecedentes del grupo de trabajo .....	26
HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y MODELO EXPERIMENTAL .....	27
Hipótesis.....	29
Objetivo general .....	29
Objetivos específicos.....	29
Modelo experimental.....	30
RESULTADOS I: CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE CÉLULAS T REGULATORIAS EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON <i>T. CRUZI</i> .....	33
Cinética de desarrollo de células T regulatorias durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	35
Cinética de progresión de la infección y desarrollo de la respuesta inmune efectora anti-parasitaria: correlación con la respuesta de células T regulatorias .....	41
Progresión de la infección .....	41
Respuesta sistémica de citoquinas pro- y anti-inflamatorias.....	46
Respuesta efectora específica antiparasitaria.....	50
Mecanismos responsables de la reducción de la frecuencia de células T regulatorias en la etapa aguda de la infección por <i>T. cruzi</i> .....	52
Proliferación.....	53
Muerte celular .....	55
Inducción de células pTreg .....	57
Papel de las señales de citoquinas pro-inflamatorias sobre los números de células Treg .....	62

Caracterización fenotípica, transcripcional y funcional de las células T regulatorias durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	66
Análisis fenotípico y funcional por citometría de flujo .....	66
Análisis transcripcional por RNAseq.....	74
Análisis funcional mediante ensayos de supresión <i>in vitro</i> .....	81
Conclusiones .....	85
RESULTADOS II: RELEVANCIA BIOLÓGICA DE LAS CÉLULAS T REGULATORIAS DURANTE LA INFECCIÓN CON <i>T. CRUZI</i> .....	87
Efecto del tratamiento con atRA <i>in vivo</i> durante la fase aguda de la infección con <i>T. cruzi</i> .....	89
Impacto del incremento en los números de células Treg durante la infección con <i>T. cruzi</i> por transferencia adoptiva de células iTreg .....	96
Diferenciación <i>in vitro</i> de células iTreg .....	97
Transferencia adoptiva de células iTreg durante la infección con <i>T. cruzi</i> ....	101
Efecto de la disminución en los números de células Treg luego de la eliminación específica durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	106
Determinación de la dosis de toxina diftérica a utilizar en la eliminación específica de células Treg.....	107
Eliminación de células Treg durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	111
Conclusiones .....	118
DISCUSIÓN.....	121
MATERIALES Y MÉTODOS.....	135
Animales de experimentación .....	137
Parásitos y modelo de infección .....	139
Métodos <i>ex vivo</i> .....	140
Cultivos celulares <i>in vitro</i> .....	148
Tratamientos <i>in vivo</i> .....	149
Métodos de biología molecular .....	151
Correlaciones, análisis estadístico y generación de gráficos .....	153
BIBLIOGRAFÍA .....	155
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	171

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Perfil epidemiológico de la enfermedad de Chagas en el mundo.....	9
Figura 2: Evolución clínica de la enfermedad de Chagas.....	11
Figura 3: Respuesta inmune innata y adaptativa en la infección por <i>T. cruzi</i> .....	14
Figura 4: Diferenciación de células tTreg y pTreg.....	18
Figura 5: Mecanismos de supresión ejercidos por las células Treg.....	20
Figura 6: La frecuencia de células Treg se reduce en bazo durante la infección aguda con <i>T. cruzi</i> .....	36
Figura 7: La frecuencia de células Treg se reduce en periferia, médula ósea e hígado durante la infección aguda con <i>T. cruzi</i> .....	38
Figura 8: La frecuencia de células Treg no se reduce en ganglios linfáticos mesentéricos y timo durante la infección aguda con <i>T. cruzi</i> .....	39
Figura 9: Cambios en los niveles de parasitemia y marcadores bioquímicos durante la progresión de la infección aguda con <i>T. cruzi</i> .....	42
Figura 10: La frecuencia de células Treg esplénicas se correlaciona con marcadores bioquímicos de progresión en la infección aguda con <i>T. cruzi</i> .....	44
Figura 11: El incremento de la dosis infectiva acelera la cinética de reducción de la frecuencia de células Treg durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	45
Figura 12: La concentración plasmática de algunas citoquinas pro-inflamatorias y de IL-10 aumenta en la infección aguda con <i>T. cruzi</i> .....	47
Figura 13: La frecuencia de células Treg esplénicas se correlaciona con la concentración plasmática de citoquinas en la infección aguda con <i>T. cruzi</i> .....	49
Figura 14: Evolución de la respuesta de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> totales y parásito-específicos en relación a la respuesta de células Treg durante la infección aguda con <i>T. cruzi</i> .....	51
Figura 15: La frecuencia de células Treg se correlaciona inversamente con la frecuencia de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> parásito-específicos en bazo durante la infección aguda con <i>T. cruzi</i> .....	52
Figura 16: Las células Treg exhiben una expansión limitada en relación a otras poblaciones celulares durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	54
Figura 17: Las células Treg no sufren apoptosis excesiva en relación a otras poblaciones celulares durante la infección aguda con <i>T. cruzi</i> .....	56
Figura 18: La generación de células pTreg se encuentra comprometida durante la infección aguda con <i>T. cruzi</i> .....	59
Figura 19: Los números absolutos de células Treg Helios <sup>+</sup> y Helios <sup>-</sup> se reducen en GLM durante el pico de la infección aguda con <i>T. cruzi</i> .....	61
Figura 20: La deficiencia en IL-6 o Caspasa-1/11 no afecta los números de células Treg en bazo y GLM durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	65
Figura 21: Las células Treg esplénicas exhiben un perfil activado durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	68
Figura 22: Las células Treg de órganos periféricos exhiben un perfil activado durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	69
Figura 23: Las células Treg esplénicas exhiben un perfil mixto central / efector durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	70

Figura 25: Análisis multivariado para el nivel de expresión de diferentes marcadores en células Treg esplénicas durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	73
Figura 26: Perfil transcripcional de las células Treg durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	75
Figura 27: Las células Treg adquieren un programa transcripcional especializado en la reparación tisular durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	78
Figura 28: Las células Treg de animales infectados con <i>T. cruzi</i> no incrementan su función supresora de la proliferación <i>in vitro</i> .....	83
Figura 29: Las células Treg de animales infectados con <i>T. cruzi</i> no incrementan su función supresora de la producción de IFN- $\gamma$ <i>in vitro</i> .....	84
Figura 30: Control <i>in vitro</i> de la actividad biológica de atRA en la inducción de células Treg.....	91
Figura 31: El tratamiento con atRA no afecta los números de células Treg durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	92
Figura 32: El tratamiento con atRA no afecta el estado de activación de las células Treg durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	93
Figura 33: El tratamiento con atRA reduce los niveles de parásitos en sangre de ratones infectados con <i>T. cruzi</i> .....	94
Figura 34: El tratamiento con atRA no modifica los números de linfocitos efectores durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	94
Figura 35: El tratamiento con atRA estimula la producción de IFN- $\gamma$ e IL-17A durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	96
Figura 36: Diferenciación <i>in vitro</i> de células iTreg.....	98
Figura 37: Las células iTreg diferenciadas <i>in vitro</i> son estables y tienen capacidad supresora.....	100
Figura 38: Las células iTreg son estables luego de la transferencia a animales infectados con <i>T. cruzi</i> .....	101
Figura 39: La transferencia adoptiva de células iTreg afecta el control de la replicación parasitaria en la infección aguda con <i>T. cruzi</i> .....	103
Figura 40: La transferencia adoptiva de células iTreg impacta sobre los números de linfocitos T efectores durante la fase aguda de la infección con <i>T. cruzi</i> .....	105
Figura 41: La transferencia adoptiva de células iTreg no modifica la producción de citoquinas efectoras durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	106
Figura 42: Puesta a punto de la dosis de DT a utilizar en experimentos de eliminación de células Treg.....	108
Figura 43: La eliminación de células Treg por administración de DT es eficiente en animales infectados con <i>T. cruzi</i> .....	110
Figura 44: La eliminación de células Treg al d11-12pi no afecta la progresión de la infección con <i>T. cruzi</i> .....	112
Figura 45: La eliminación de células Treg al d11-12pi no impacta sobre los números de linfocitos efectores durante infección con <i>T. cruzi</i> .....	113
Figura 46: La eliminación de células Treg al d5-6pi reduce los niveles de parásitos al d19pi en órganos blancos de la infección por <i>T. cruzi</i> .....	114
Figura 47: La eliminación de células Treg en momentos tempranos de la infección con <i>T. cruzi</i> incrementa los números y la funcionalidad de las células T CD8 <sup>+</sup> parásito-específicas.....	116



Figura 48: La eliminación de células Treg en momentos tempranos de la infección con <i>T. cruzi</i> no afecta los números de las células T CD8 <sup>+</sup> parásito-específicas en la etapa aguda tardía.....	117
Figura 49: Modelo de acción de las células Treg en la progresión de la infección con <i>T. cruzi</i> .....	134
Tabla 1: Principales marcadores de función supresora, migración, fenotipo central/efector y polarización expresados por las células Treg.....	23
Tabla 2: Expresión Diferencial de Genes en las células Treg luego de la infección con <i>T. cruzi</i> .....	76
Tabla 3: Expresión Diferencial de Genes asociados al programa de reparación tisular en células Treg luego de la infección con <i>T. cruzi</i> .....	80
Tabla 4: Características de los anticuerpos monoclonales para ratón utilizados en citometría de flujo.....	146



## RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo intracelular *Trypanosoma cruzi*. La infección cursa con una fase aguda que generalmente es asintomática, para luego progresar a la cronicidad, donde una alta proporción de pacientes desarrollan síntomas severos. Si bien la patogenia de la enfermedad es compleja y aún no se conoce completamente, se considera que está relacionada tanto a la persistencia del parásito como al desarrollo de respuestas inmunes excesivas. Así, la respuesta inmune efectora que se monta en el hospedador resulta un factor clave en el control del parásito y en el desarrollo de inmunopatología. Por otro lado, las células T regulatorias Foxp3<sup>+</sup> presentan un rol dual en las infecciones ya que deben permitir que se generen respuestas inmunes potentes capaces de restringir al patógeno, pero al mismo tiempo, deben limitar estas respuestas para evitar el daño a los tejidos del hospedador y el desarrollo de inmunopatología. En este trabajo de tesis se investigaron las características y el rol de las células T regulatorias durante la fase aguda de la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. Se demostró que durante la infección, las células T regulatorias se encuentran activadas, dado que incrementan la expresión de un amplio rango de marcadores de función supresora. Además, adquieren un programa transcripcional especializado el control de las respuestas inflamatorias tipo 1 y en la reparación tisular. A pesar de ello, la frecuencia de células T regulatorias en periferia se reduce a lo largo de la fase aguda como consecuencia de una baja tasa de proliferación y de una diferenciación limitada hacia este perfil en órganos periféricos. Al estudiar la relevancia biológica de la disminución en la frecuencia de células T regulatorias activadas, se determinó que esta reducción es necesaria para el surgimiento de la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> parásito-específicos responsables del control en los niveles de *Trypanosoma cruzi*. Los hallazgos de esta tesis contribuyen a la comprensión de la relación entre las respuestas inmunes adaptativas y la progresión de la infección. El entendimiento de estos factores resulta relevante en el desarrollo de estrategias de inmunointervención durante la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: enfermedad de Chagas / *Trypanosoma cruzi* / células T regulatorias / Foxp3 / linfocitos T CD8<sup>+</sup>



## ABREVIACIONES Y ACRÓNIMOS

7-AAD: del inglés, <i>7-Aminoactinomycin D</i>	CTLA-4: del inglés, <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
ADN: ácido desoxirribonucleico	CXCR3: del inglés, <i>CXC chemokine receptor 3</i>
ADNc: ADN copia	d: día
AMPc: del inglés, <i>adenosine monophosphate</i> en su forma cíclica	dpi: día post-infección
ANOVA: del inglés, <i>analysis of variance</i>	DEREG: del inglés, <i>depletion of regulatory T cell</i>
APC: del inglés, <i>allophycocyanin</i>	DMSO: dimetil sulfóxido
APC-Cy7: APC conjugado con <i>cyanine 7</i>	dNTPs: del inglés, <i>deoxyribose-nucleosides triphosphate</i>
APC-eFluor-780: APC conjugado con <i>eFluor-780</i>	DT: del inglés, <i>diphtheria toxin</i>
Areg: anfirregulina	DTR: del inglés, <i>diphtheria toxin receptor</i>
ARN: ácido ribonucleico	DTU: del inglés, <i>discrete typing unit</i>
ARNmit: ARN mitocondrial	EDTA: del inglés, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ARNr: ARN ribosomal	EEM: error estándar de la media
ATP: del inglés, <i>adenosine triphosphate</i>	ELISA: del inglés, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
atRA: del inglés, <i>all-trans retinoic acid</i>	FAM: del inglés, <i>fluorescein amidite</i>
Blimp-1: del inglés, <i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i>	Fas: del inglés, <i>first apoptosis signal receptor</i>
CCR7: del inglés, <i>C-C chemokine receptor type 7</i>	FasL: del inglés, <i>Fas ligand</i>
CD#: del inglés, <i>cluster of differentiation</i>	FITC: del inglés, <i>fluorescein isothiocyanate</i>
CD: célula dendrítica	Foxp3: del inglés, <i>forkhead box P3</i>
CM: células musculares	FR4: del inglés, <i>folate receptor 4</i>
CMH: complejo mayor de histocompatibilidad	FSC-A: del inglés, <i>forward scatter-area</i>
CNS: del inglés, <i>non-coding conserved sequence</i>	GAPDH: del inglés, <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
CP: componente principal	GARP: del inglés, <i>glycoprotein A repetitions predominant</i>
CPK: del inglés, <i>creatine phosphokinase</i>	GFP: del inglés, <i>green fluorescent protein</i>
CPK-MB: del inglés, <i>creatine phosphokinase-muscle/brain</i>	eGFP: del inglés, <i>enhanced GFP</i>

GITR: del inglés, *glucocorticoid-induced TNFR-related protein*

GLI: ganglio linfático inguinal

GLM: ganglio linfático mesentérico

GOT: del inglés, *glutamic-oxaloacetic transaminase*

GPT: del inglés, *glutamic-pyruvic transaminase*

Hb: hemoglobina

HEPES: del inglés, *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

ICOS: del inglés, *inducible T-cell costimulator*

IDO: del inglés, *indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase*

IFN: interferón

IL-#: interleuquina

IL-17RA: del inglés, *interleukin 17 receptor A*

INF: infectado

iNOS: del inglés, *inducible nitric oxide synthase*

Iono: ionomicina

IPEX: del inglés, *immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*

IRES: del inglés, *internal ribosome entry site*

IRF4: del inglés, *interferon regulatory factor 4*

KLRG1: del inglés, *killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*

KO: del inglés, *gene knockout*

LAG-3: del inglés, *lymphocyte-activation gene 3*

LAP: del inglés, *latency-associated peptide*

LDH: del inglés, *lactate dehydrogenase*

Li T: linfocito T

Mac: macrófago

MCP-1: del inglés, *monocyte chemoattractant protein 1*

mrTGF- $\beta$ : del inglés, *mouse recombinant TGF- $\beta$*

MyD88: del inglés, *myeloid differentiation primary response 88*

NADPH: del inglés, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, en su forma reducida

NFATc1: del inglés, *nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1*

NF- $\kappa$ B: del inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NI: no infectado

NK: del inglés, *natural killer*

NOD: del inglés, *nucleotide-binding oligomerization domain*

Nrp-1: neuropilina-1

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PAMPs: del inglés, *pathogen-associated molecular patterns*

PBS: del inglés, *phosphate-buffered saline*

PCR: del inglés, *polymerase chain reaction*

PD-1: del inglés, *programmed cell death protein 1*

PDGFB: del inglés, *platelet-derived growth factor subunit B*

PE: del inglés, *phycoerythrin*

PE-Cy7: PE conjugado con *cyanine 7*

PerCP: del inglés, *peridinin chlorophyll protein*

PerCP-Cy5.5: PerCP conjugado con *cyanine 5.5*

PerCP-eFluor-710: PerCP conjugado con *eFluor-710*

pi: post-infección

PMA: del inglés, *phorbol 12-myristate 13-acetate*

PRRs: del inglés, *pattern recognition receptors*

rIL-2: del inglés, *recombinant IL-2*

SBF: suero bovino fetal

SP: simple positiva

SSC-A: del inglés, *side scatter-area*

*T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*

Tbx21: del inglés, *T-box transcription factor 21*

Tconv: célula T convencional

TCR: del inglés, *T-cell receptor*

TGF- $\beta$ : del inglés, *transforming growth factor beta*

Th1: del inglés, *T helper 1*, linfocito T colaborador de la inflamación tipo 1

Th17: del inglés, *T helper 17*, linfocito T colaborador de la inflamación tipo 17

TIGIT: del inglés, *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*

TLR(s): del inglés, *Toll-like receptor(s)*

TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

TNF: del inglés, *tumor necrosis factor*

Treg: célula T regulatoria

iTreg: célula Treg diferenciada *in vitro*

pTreg: célula Treg de origen periférico

tTreg: célula Treg de origen tímico

TRIF: del inglés, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$*

VHB: virus de hepatitis B

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

WT: del inglés, *wild type*





# INTRODUCCIÓN



## Enfermedad de Chagas

### Aproximación biomédica

La tripanosomiasis americana humana, conocida comúnmente en nuestra región como el mal de Chagas, es una de las enfermedades parasitarias con mayor prevalencia en nuestro continente de acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (2016). Esta enfermedad es endémica en 22 países de América, abarcando desde el sur de los Estados Unidos hasta la Patagonia (figura 1) [1]. En el último siglo los movimientos migratorios produjeron la expansión de la infección desde zonas endémicas hacia otras regiones del globo, por lo que actualmente, la Organización Mundial de la Salud estima que existen 8 millones de personas infectadas en el mundo. En Latinoamérica, 100 millones de personas viven en situación de riesgo de infección, con 50.000 nuevos casos diagnosticándose cada año, y generando 10.000 muertes anuales de acuerdo a datos de la OPS. Atendiendo a estas cifras, y considerando las discapacidades físicas que genera en las personas infectadas y la carga monetaria que se le atribuye, la enfermedad de Chagas es una de las principales infecciones parasitarias de occidente, constituyendo un problema sanitario a escala global [1, 2].

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo intracelular flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). La principal vía de transmisión de este parásito a humanos en regiones endémicas es la vectorial que involucra a insectos hematófagos, triatominos de la familia Reduviidae, comúnmente conocidos como vinchucas o chinches. Además de humanos, estos insectos pueden infectar a más de 100 especies de mamíferos, manteniendo así al *T. cruzi* en reservorios salvajes en la naturaleza a lo largo de América [1]. La transmisión ocurre cuando



**Figura 1: Perfil epidemiológico de la enfermedad de Chagas en el mundo.**

Distribución global de casos de la enfermedad de Chagas. En rojo se muestra la región endémica y las rutas de migración desde América latina. Adaptado de Coura y colaboradores [1].

los vectores infectados se alimentan de la sangre de un individuo y depositan sus heces, que contienen tripomastigotes (forma infectiva de *T. cruzi*), en las membranas mucosas o sobre la piel del vertebrado. El parásito atraviesa esta barrera a través de zonas donde la integridad se encuentra comprometida, y una vez que ingresa al organismo, invade varios tipos de células nucleadas. En el citoplasma de estas células, los tripomastigotes se diferencian a su forma replicativa de amastigote, y al cabo de un periodo de 4 a 5 días se transforman en tripomastigotes. Los tripomastigotes son capaces de lisar las células hospedadoras y así invadir tejidos adyacentes o diseminarse mediante la circulación sanguínea y linfática. El ciclo se completa cuando los triatomíneos se alimentan de sangre de un mamífero infectado, produciéndose la ingesta de tripomastigotes libres [2].

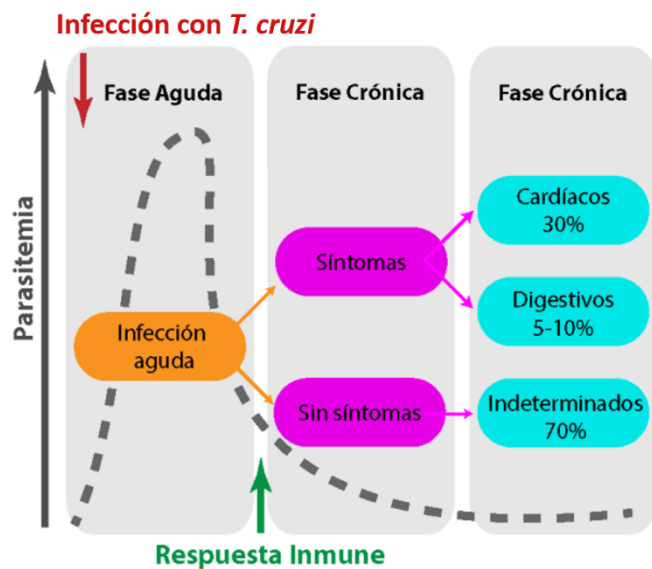
Otras formas de transmisión del *T. cruzi* a humanos también son posibles, e incluyen la vía congénita por infección materna, la vía oral mediante el consumo de alimentos y bebidas contaminados con triatomíneos infectados o sus heces, y la vía parenteral por transfusiones de sangre y trasplantes de órganos que no fueron testados para la presencia del parásito, así como por accidentes de laboratorio [3]. La transmisión vertical y la vía parenteral por transfusiones corresponden a las principales vías de infección en áreas no endémicas donde la enfermedad de Chagas es emergente, y en regiones endémicas donde los programas de control vectorial fueron efectivos [4].

Una vez que ocurre el contagio del parásito, se reconocen dos fases de la enfermedad. En las primeras 8 a 12 semanas transcurre la etapa aguda, generalmente de manera asintomática o con manifestaciones inespecíficas, por lo cual la mayoría de las infecciones agudas no son detectadas. En este momento, se distinguen en sangre altos niveles de tripomastigotes. Si bien todas las células nucleadas son susceptibles a la infección, el parásito exhibe un particular tropismo hacia células musculares y ganglionares, formándose pseudocistos de amastigotes en replicación en tejido muscular esquelético, liso y cardíaco [5]. Las células que resultan infectadas en esta etapa inducen un proceso de apoptosis y pueden ser tomadas por macrófagos que transportan así el parásito hacia bazo, ganglios e hígado [6]. Hacia el final de la etapa aguda, la respuesta inmune logra controlar la replicación parasitaria, por lo que los niveles de parásitos en sangre y tejidos se tornan indetectables mediante métodos convencionales [7]. Sin embargo, dado que el *T. cruzi* no logra ser eliminado por completo, persiste alojado en los órganos a lo largo de la vida del hospedador. Así, la fase aguda deriva en una etapa

crónica en la que el hospedador establece un equilibrio dinámico con el parásito (figura 2).

En la etapa crónica inicial de la enfermedad de Chagas, la mayoría de los pacientes permanecen asintomáticos. A medida que avanza, se distingue un amplio rango de desenlaces clínicos, desde ausencia de síntomas (forma indeterminada) hasta alteraciones severas en un 30-40% de los pacientes, con compromiso cardiovascular y/o gastrointestinal que se manifiesta 10 a 30 años después de contraída la infección (formas determinadas) (figura 2). La patología cardíaca es la manifestación clínica más severa y frecuente, presentándose en 30% de los individuos que cursan la fase crónica [8]. Estos pacientes presentan afecciones del sistema de conducción y del miocardio, y pueden desarrollar miocarditis severa, fibrosis, arritmias, insuficiencia cardíaca, tromboembolismo, e incluso sufrir paro cardíaco [9, 10]. Las disfunciones gastrointestinales son menos frecuentes, se presentan en un 5-10 % de los casos de Chagas crónico, y afectan principalmente el esófago, el colon, o ambos. En estos pacientes las alteraciones más importantes se caracterizan por fallas en las funciones motoras, secretorias y de absorción, y en los casos severos, la afección de las neuronas de los plexos ganglionares conduce a la dilatación de los órganos [11].

A pesar de que la sintomatología de la enfermedad de Chagas ha sido descrita exhaustivamente desde su descubrimiento, los mecanismos que determinan la patogénesis aún no se



**Figura 2: Evolución clínica de la enfermedad de Chagas.**

Luego de la infección con *T. cruzi*, los individuos atraviesan una fase aguda que dura entre 2 y 3 meses, caracterizada por una alta parasitemia y una fuerte activación del sistema inmune. Si la infección se detecta en esta etapa y se sigue el tratamiento farmacológico, cerca del 75 % de los pacientes se curan. En caso de no ser detectada o curada, los individuos ingresan a la fase crónica de la enfermedad cuando la respuesta inmune del hospedador logra controlar los niveles de parásito. La mayoría de los pacientes que cursan la etapa crónica permanecen asintomáticos (indeterminados). Sin embargo, al cabo de al menos 10 años en la fase crónica, una proporción de la población infectada desarrolla patología asociada a los tejidos cardíacos y/o digestivos. Adaptado a partir de Dutra y colaboradores [8].

conocen completamente, si bien se reconoce que dependen de factores del parásito y del hospedador. En este sentido, las evidencias indican que el daño tisular en las fases aguda y crónica resulta tanto de la acción directa del parásito como de la respuesta inflamatoria que se desencadena [9]. Particularmente durante la patología crónica, el desarrollo de un gran espectro de afecciones está relacionado a la variabilidad genética y fenotípica de *T. cruzi* [12, 13]. Además, se demostró la presencia del parásito en los tejidos dañados [14, 15], por lo que la hipótesis actual considera que la persistencia del parásito está directa y causalmente relacionada con la muerte celular y el desarrollo de respuestas inmunes inducidas por *T. cruzi* en estos tejidos [16]. En concordancia con esto, el desarrollo de la forma cardíaca ha sido también asociado a una respuesta inmune con gran predominio del perfil inflamatorio que resulta en daño tisular, mientras que la permanencia en la fase indeterminada se vincula a un ambiente anti-inflamatorio predominante [9, 17, 18]. Por otra parte, el hecho de que *T. cruzi* presente epítopes con reactividad cruzada hacia moléculas del hospedador, llevó a algunos autores a postular la existencia de autorreactividad en el origen de la patología chagásica [19, 20].

Actualmente, solo dos drogas antiparasitarias están disponibles para el tratamiento de pacientes chagásicos: benznidazol y nifurtimox. Ambas drogas requieren tiempos de administración prolongados y su uso se recomienda en casos de enfermedad aguda, donde su eficacia es alta y la mayoría de los individuos logran curarse. Sin embargo, la efectividad de estas drogas disminuye a medida que la enfermedad evoluciona, obteniéndose una baja tasa de curación en pacientes que presentan las formas determinadas de la enfermedad [5, 21]. Además, a pesar de su uso por más de 50 años, estos medicamentos exhiben un amplio rango de efectos no deseados frecuentes, por lo que en muchos casos el tratamiento se discontinúa [9].

A más de un siglo del descubrimiento del *T. cruzi* y la enfermedad de Chagas, aún quedan muchos desafíos por resolver. El desarrollo de terapias profilácticas y/o terapéuticas es imperativo. En este sentido, teniendo en cuenta que la respuesta inmune participa tanto en el control del parásito como en el establecimiento de la patología crónica, una comprensión profunda de las características de esta respuesta tanto al momento de su inducción como durante la fase crónica, resulta fundamental para el conocimiento de puntos estratégicos de intervención y el diseño de nuevos tratamientos.

*Respuesta inmune frente a Trypanosoma cruzi*

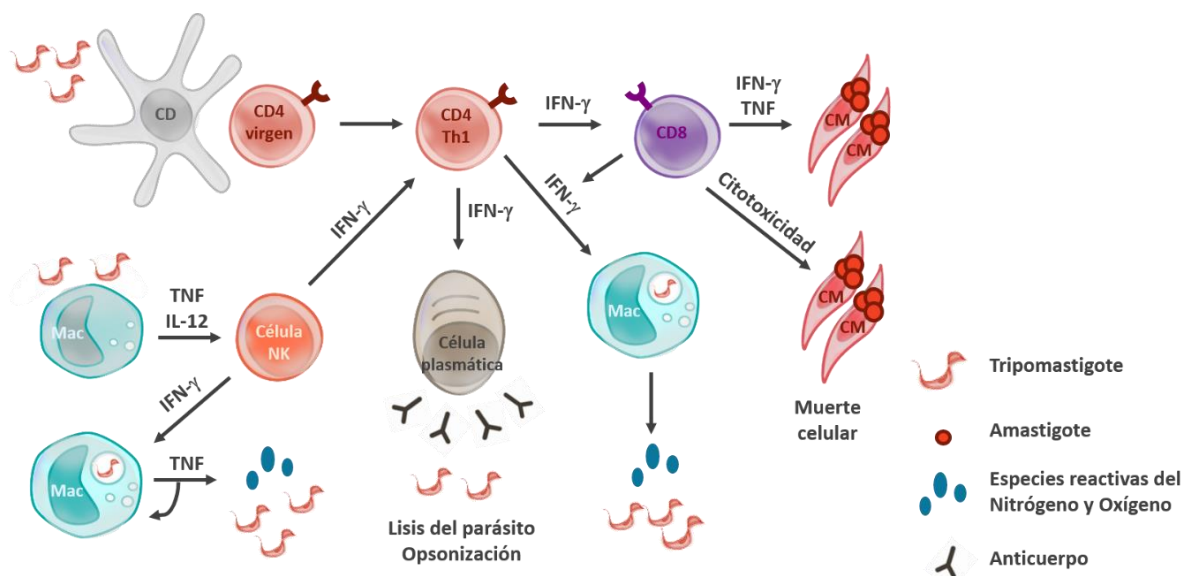
La respuesta inmune que se induce frente al parásito se constituye como un determinante clave tanto de la resistencia a la infección como de la patogénesis de la enfermedad chagásica [7]. El control de la replicación de *T. cruzi* y de su propagación en los tejidos del hospedador depende de la acción conjunta de células y moléculas efectoras de la inmunidad innata y adaptativa. Macrófagos (Mac), células dendríticas (CD), células NK, linfocitos B y T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> participan en el reconocimiento del *T. cruzi* y en la ejecución de mecanismos para su destrucción. Los macrófagos y las células dendríticas reconocen componentes microbianos y actúan como primera línea de defensa, al mismo tiempo que juegan papeles claves en la dirección del desarrollo de la inmunidad adaptativa. Adicionalmente los anticuerpos, un gran número de citoquinas y otros factores solubles son necesarios para orquestar una respuesta inmune eficiente (figura 3).

En los estadios iniciales de la infección, los macrófagos y las células dendríticas son capaces de detectar al *T. cruzi* en su forma de tripomastigote. Esto es posible a través de la expresión de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) que unen diversos componentes del parásito conocidos como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs). Entre las distintas familias de PRRs que reconocen a *T. cruzi* se distinguen receptores tipo NOD y receptores tipo Toll (TLRs) [13]. El estudio en ratones deficientes en MyD88 y TRIF, moléculas adaptadoras que transducen las señales de los TLRs, indica que la señalización a través de estos receptores sería esencial para la resistencia a la infección [22]. Hasta el momento, se ha descrito que los siguientes TLRs y sus ligandos tienen importancia *in vivo* durante la infección con *T. cruzi*: el heterodímero TLR2-TLR6 une mucinas ancladas a glicosilfosfatidilinositol de la superficie del parásito [23, 24] y TLR2 también reconoce a la proteína Tc52 [25]; TLR4 se une a glicoinositolfosfolípidos ricos en ceramida de la superficie del *T. cruzi* [26]; TLR9 se une a motivos CpG no metilados del ADN del parásito [24]; y TLR7 reconoce moléculas de ARN parasitario [27].

El reconocimiento de componentes de *T. cruzi* por parte de los TLRs y otros PRRs desencadena la activación y maduración de macrófagos y células dendríticas, principalmente a través de la activación de los factores NF- $\kappa$ B y NFATc1. Esto se traduce en la expresión de un gran número de genes inflamatorios: citoquinas (IL-12, TNF, IFN- $\beta$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ ), quemoquinas (MCP-1), y enzimas que sintetizan moléculas con

actividad microbicida (iNOS y NADPH oxidasa, que producen especies reactivas del nitrógeno y del oxígeno, respectivamente, IDO y GTPasas inducibles por IFN) [7, 28-30]. Los mediadores solubles son además capaces de amplificar la respuesta inflamatoria, en primer lugar al reclutar un mayor número de leucocitos de la inmunidad innata a la zona, entre ellos neutrófilos y células NK [13], y en segundo lugar al estimular de forma autocrina y paracrina la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas efectoras microbicidas. Estos mecanismos juegan así un rol importante en el control del parásito durante los primeros 7 a 10 días luego de la infección.

La maduración de las células dendríticas permite la presentación de antígenos parasitarios y la activación y diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes durante la infección, quienes en presencia de IL-12 e IFN- $\gamma$  expresan el factor de transcripción maestro T-bet y se diferencian a linfocitos efectores del perfil Th1. Estos linfocitos están



**Figura 3: Respuesta inmune innata y adaptativa en la infección por *T. cruzi*.**

Una vez que ingresa al organismo, el *T. cruzi* es reconocido por células de la inmunidad innata como los macrófagos (Mac) y las células dendríticas (CD), quienes fagocitan al parásito. Una vez activados, los macrófagos son capaces de producir moléculas efectoras (especies reactivas del nitrógeno y oxígeno) que actúan directamente sobre *T. cruzi*. También liberan citoquinas como IL-12 y TNF que activan a otras células, entre ellas las células NK, las cuales producen IFN- $\gamma$  en respuesta. Esto genera una retroalimentación positiva que estimula aún más a los macrófagos. Las células dendríticas establecen el puente con la inmunidad adaptativa al presentar antígenos parasitarios a linfocitos T vírgenes y secretar citoquinas pro-inflamatorias. El microambiente, altamente rico en IL-12 e IFN- $\gamma$ , condiciona la polarización de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> al perfil Th1, que se expanden y contribuyen en la producción de IFN- $\gamma$ . Esta citoquina induce la activación de un número mayor de macrófagos y la producción de anticuerpos por parte de células plasmáticas. La respuesta humoral de anticuerpos contribuye en la opsonización y lisis de tripomastigotes. Al mismo tiempo, se induce la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos, capaces de producir citoquinas pro-inflamatorias y moléculas citotóxicas que destruyen células infectadas con amastigotes de *T. cruzi*, entre ellas células musculares (CM). Adaptado a partir de Junqueira y colaboradores [7].



especializados en la liberación de IFN- $\gamma$ , citoquina que en este momento de la infección induce la activación adicional de las células fagocíticas para la destrucción del parásito, y colabora con la producción de anticuerpos por células plasmáticas y con la citotoxicidad de linfocitos T CD8<sup>+</sup> [30].

Por otro lado, la respuesta específica de células T CD8<sup>+</sup> se induce cuando péptidos de *T. cruzi*, especialmente de las enzimas *trans*-sialidasa del parásito, son presentados en moléculas del CMH clase I de células infectadas. Unos pocos epítopes de esta familia de enzimas son los principales inductores de la activación de esta respuesta celular, fenómeno que se conoce como inmunodominancia. Estas células T CD8<sup>+</sup>, parásito-específicas, ejercen su función efectora a través de la producción de IFN- $\gamma$  y TNF, y de la actividad citotóxica directa sobre células infectadas. Se ha sugerido que el IFN- $\gamma$  liberado por estas células no solo potenciaría la función microbicida de células de la inmunidad innata, sino que induciría la producción de especies reactivas del nitrógeno por parte de las propias células infectadas [31]. En cuanto a la actividad citotóxica, esta es llevada a cabo mediante la liberación de perforinas y granzimas contenidas en los gránulos de estos linfocitos (proceso conocido como degranulación) y a la activación de la vía Fas/FasL, que producen la muerte por apoptosis de células infectadas [7, 29]. La respuesta de linfocitos citotóxicos es de aparición tardía, siendo evidente luego de al menos 8 días de infección, y persiste incluso a tiempos muy prolongados [32, 33]. Si bien esta inmunidad celular CD8<sup>+</sup> es esencial para el control del parásito durante todas las etapas de la infección, la misma es insuficiente para la eliminación completa del patógeno [34]. De hecho, diferentes estrategias que potencian la respuesta parásito-específica de linfocitos T CD8<sup>+</sup> también incrementan la resistencia del hospedador a la infección [35-37].

Adicionalmente, los linfocitos B son esenciales en la generación de una respuesta humoral de anticuerpos mediante la secreción de inmunoglobulinas M y G [38, 39]. Se ha descrito que los anticuerpos ejercen actividad protectora al aglutinar a *T. cruzi*, lisar directamente al parásito actuando en conjunto con el complemento, facilitar su opsonización y fagocitosis, y mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos [29]. Durante la fase aguda de la infección, estas células son también capaces de modular la respuesta de linfocitos T. En este sentido, se ha descrito que las células B realizan presentación cruzada de antígenos de *T. cruzi* a células T CD8<sup>+</sup> para inducir su activación y diferenciación [40]. Los linfocitos B ejercen además un rol importante en el reclutamiento

de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a bazo, y en la generación y el mantenimiento de células T efectoras y de memoria central [41].

En conjunto, la ejecución de diferentes mecanismos efectores de las respuestas inmunes innatas y adaptativas resultan críticos en el control de *T. cruzi*. A pesar de ello, la eliminación por completo del parásito no se logra, derivando en una infección crónica. La persistencia de *T. cruzi* aún luego del establecimiento de respuestas inmunes robustas sugiere que el parásito pone en juego mecanismos de evasión de la respuesta inmune a fin de eludir su detección y destrucción. En este contexto, el conocimiento cabal de los mecanismos de inmunoprotección, así como de los de inmunoevasión, es necesario para diseñar nuevos enfoques terapéuticos capaces de potenciar la respuesta inmune natural, especialmente de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, proporcionando nuevas oportunidades para alterar el curso de la enfermedad de Chagas crónica.

Con respecto al desarrollo de inmunopatología chagásica, respuestas inmunes exacerbadas con alta producción de citoquinas pro-inflamatorias relacionadas a respuestas tipo 1, especialmente IFN- $\gamma$ , se han asociado con el desarrollo de lesiones crónicas. Estudios en cohortes de pacientes demostraron que aquellos que padecían cardiomiopatía chagásica crónica muestran niveles incrementados de IFN- $\gamma$  en suero y de células productoras de esta citoquina con respecto a pacientes indeterminados, mientras que estos últimos favorecen la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 [42-46]. En concordancia con estas observaciones, pacientes con la forma indeterminada de la enfermedad presentaron altos porcentajes de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> productoras de IL-10 que se correlacionaron con un menor porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados [47, 48]. Paradójicamente, pacientes bajo condiciones inmunosupresoras, generalmente exhiben un proceso inflamatorio exacerbado y niveles de parasitemia elevados [49, 50]. Por otra parte, estudios de la infección en modelos murinos describen que la inducción de IL-10 resulta esencial para la modulación de la respuesta inflamatoria y la sobrevivencia de los animales infectados [51, 52]. En conjunto, estas observaciones sugieren que para un control exitoso de la infección y un equilibrio adecuado entre *T. cruzi* y su hospedador, es necesario el establecimiento de un balance entre respuestas inmunes lo suficientemente fuertes como para controlar al parásito, pero al mismo tiempo limitadas a modo de prevenir una destrucción importante en los tejidos del hospedador.

## Células T regulatorias Foxp3<sup>+</sup>

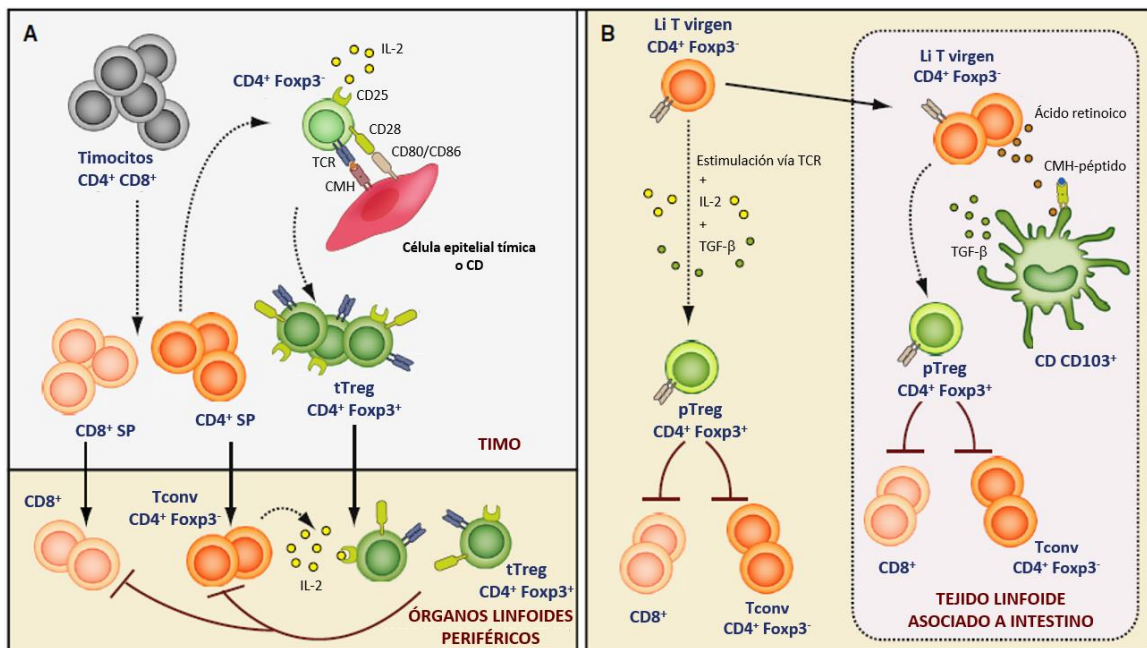
### *Características generales*

Las células T regulatorias (Treg) corresponden a una subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> cuya función central es suprimir las respuestas efectoras de otras células del sistema inmune, a fin de mantener la homeostasis en el curso de las reacciones inflamatorias y la tolerancia inmunológica. Estas células se caracterizan por la expresión del factor de transcripción Foxp3, que actúa como regulador maestro en su diferenciación y función supresora [53, 54]. La importancia de las células Treg en mantener la tolerancia inmune quedó demostrada al descubrir que mutaciones con pérdida de función en el gen de Foxp3 resultan en autoinmunidad espontánea tanto en humanos (síndrome IPEX) como en ratones (llamados scurfy) [55-57]. A partir de ese momento, se multiplicaron las investigaciones en torno al desarrollo de las células Treg, sus características fenotípicas, y los mecanismos mediante los cuales ejercen regulación inmune, así como el estudio de la función de estas células bajo diferentes contextos inflamatorios. De esta forma, se determinó que una funcionalidad deficiente por parte de las células Treg está involucrada en el desarrollo de enfermedades autoinmunes frecuentes [58-61], en el rechazo del feto durante el embarazo [62], en los procesos alérgicos [63] y en la inflamación intestinal por reacciones hacia microorganismos comensales [64]. Asimismo, el incremento en los números de células Treg previene el rechazo de transplantes [65, 66], mientras que frena la respuesta anti-tumoral beneficiosa en pacientes con cáncer [67, 68]. Las células Treg también intervienen en el curso de las infecciones, donde sus efectos pueden ser tanto beneficiosos como deletéreos [69].

Las células Treg se consideran una población de larga vida que se mantiene por auto-renovación de células Treg maduras y que es estable tanto en condiciones fisiológicas como en diversos contextos inflamatorios [70, 71]. La expresión continua y estable de Foxp3 se mantiene en estas células mediante una estricta regulación epigenética del promotor y de regiones no codificantes conservadas (llamadas CNS) en el locus del gen de Foxp3 [72, 73].

Las células Treg han sido clasificadas en base a su origen en células Treg tímicas (tTreg) y células Treg periféricas (pTreg). Las primeras, se desarrollan en timo a partir de

células T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> (llamados timocitos CD4 simple positivos (CD4SP)), mientras que las segundas, se generan en órganos linfoides periféricos a partir de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes expuestos a distintas señales regulatorias [74] (figura 4). En ambos casos, la diferenciación a célula Treg necesita de la estimulación de las células progenitoras a través de señales antígeno-específicas mediante el TCR, la co-estimulación a través de CD28, y la señalización de otros factores que varían de acuerdo al órgano. Así, la intensidad y la duración adecuada de estas señales inducen en las células progenitoras cambios epigenéticos (regiones demetiladas del ADN específicas de células Treg) y la expresión de Foxp3, para dar origen a células con identidad Treg [75]. Dentro de los diferentes factores necesarios para que esto ocurra se destacan las citoquinas IL-2 y TGF-β, siendo esta última necesaria solo durante el desarrollo periférico. Particularmente, el tejido linfode asociado a la mucosa intestinal y los ganglios linfáticos mesentéricos constituyen sitios anatómicos privilegiados para la diferenciación de células pTreg, debido



**Figura 4: Diferenciación de células tTreg y pTreg.**

**A)** Las células tTreg se generan a partir de timocitos CD4<sup>+</sup> SP, en presencia de una estimulación fuerte a través del receptor de célula T (TCR) con antígenos presentados en el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de células epiteliales tímicas o células dendríticas (CD), una co-estimulación mediante la interacción de CD28 y CD80/CD86, y la señalización de IL-2 a través de su receptor de alta afinidad CD25. Estas células migran a periferia, donde son capaces de suprimir las respuestas de células efectoras T CD8<sup>+</sup> y Tconv (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup>), entre otras. **B)** Las células pTreg se diferencian en periferia a partir de linfocitos T (Li T) CD4<sup>+</sup> vírgenes bajo la estimulación antigénica en condiciones tolerogénicas, con una co-estimulación subóptima, y en presencia de IL-2 y TGF-β. La inducción de estas células es prominente en tejido linfode asociado a la mucosa intestinal y en ganglios linfáticos mesentéricos, donde residen células dendríticas CD103<sup>+</sup> productoras de TGF-β y ácido retinoico. Adaptado de Josefowicz y colaboradores [74].

a la presencia de células dendríticas CD103<sup>+</sup> productoras de TGF- $\beta$  y ácido retinoico [74, 76]. El ácido retinoico, junto a otros metabolitos dietarios y a productos derivados del metabolismo de la microbota comensal, entre ellos ácidos grasos de cadena corta, favorecen la generación de células Treg en estos órganos al estabilizar la transcripción de Foxp3 [77, 78].

Actualmente, no se conoce de forma fehaciente si las células Treg con orígenes diferentes son requeridas en distintos contextos biológicos o si presentan funciones biológicas redundantes. Uno de los principales obstáculos para ello es la dificultad de distinguir a estas células mediante marcadores fenotípicos. En este sentido, el factor de transcripción Helios y el receptor de superficie celular Neuropilina-1 (Nrp-1) se han propuesto como marcadores potencialmente útiles para distinguir entre células tTreg y pTreg, debido a su expresión preferencial en las células Treg de origen tímico [79-81]. A pesar de ello, el uso de estos marcadores aún es discutido, debido a que Helios se expresaría luego de la activación reciente y estaría asociado a una mayor capacidad regulatoria independiente del origen de la célula Treg [82, 83], mientras que Nrp-1 podría ser inducida en células pTreg que reciben estímulos inflamatorios [80].

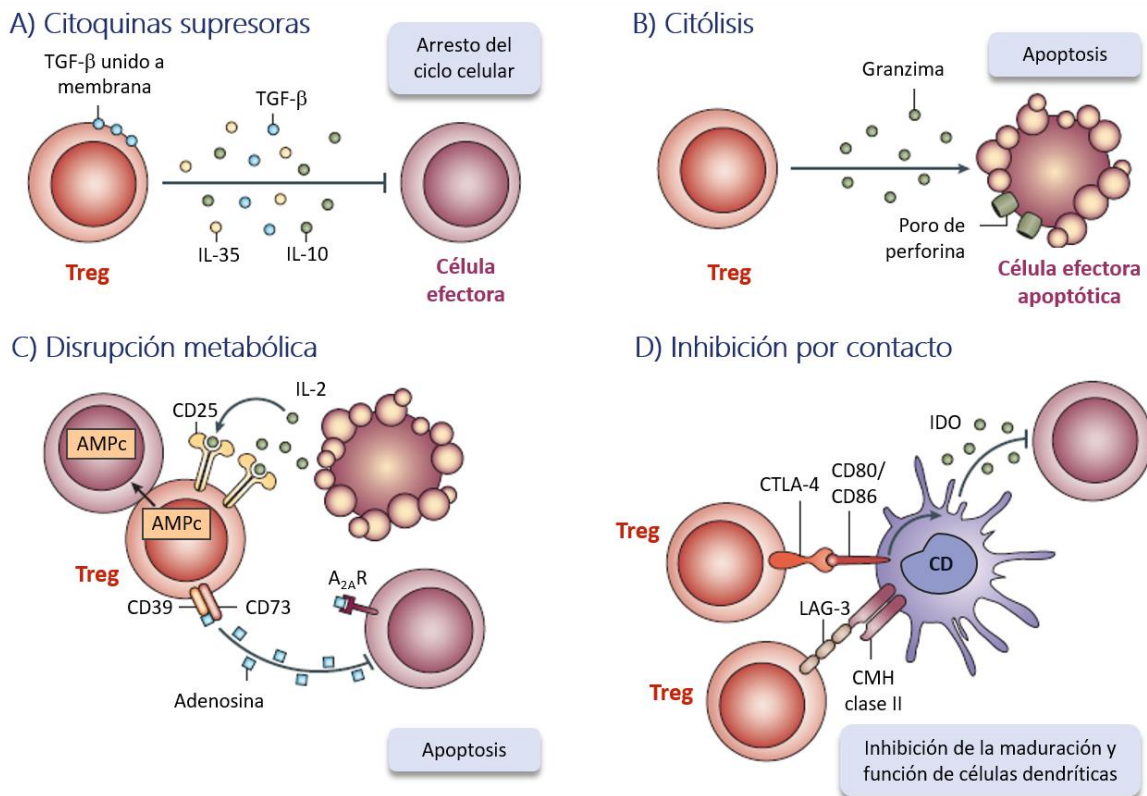
Las células Treg ejercen función supresora a través de una gran variedad de mecanismos mediante los cuales limitan las funciones de las células efectoras de la inmunidad innata y adaptativa, así como también la maduración y la función de las células presentadoras de antígeno [84, 85] (figura 5). Los mecanismos de supresión se pueden clasificar como dependientes o independientes del contacto celular, y en general se pueden incluir dentro de los siguientes grupos:

1. **Secreción o exposición de moléculas supresoras** como IL-10, TGF- $\beta$ , IL-35 y Galectina-1 que producen arresto del ciclo celular.
2. **Citólisis** mediante la liberación de perforinas y granzimas, que finaliza en la apoptosis de la célula blanco.
3. **Disrupción metabólica** mediante: el secuestro de IL-2, citoquina necesaria para la supervivencia de linfocitos, a través del receptor de alta afinidad (CD25) expresado en células Treg; la producción de adenosina luego de la acción de las ectoenzimas CD39 y CD73 sobre el ATP extracelular; y la transferencia de AMPc a través de uniones de membrana tipo “gap”. Estos mecanismos llevan a la apoptosis de las

células efectoras o a un estado inmaduro de las células presentadoras de antígenos.

- Inhibición por contacto** a través de receptores inhibitorios, entre ellos CTLA-4, GITR, LAG-3 y TIGIT, los cuales reprimen la maduración y/o activación de células dendríticas. CTLA-4 además es capaz de inducir la expresión de IDO en estas células, enzima que cataboliza el triptófano liberando productos pro-apoptóticos. Nrp-1 también puede incluirse en este grupo. Esta molécula establece contactos prolongados con células dendríticas, restringiendo el acceso a otras poblaciones celulares. Todos estos mecanismos afectan la presentación antigénica.

Adicionalmente, se ha reportado que las células Treg requieren de la señalización por el TCR para una activación y función supresoras óptimas [86, 87]. Sin embargo, luego de su



**Figura 5: Mecanismos de supresión ejercidos por las células Treg.**

Gráfico que muestra varios de los mecanismos de supresión centrados en cuatro modelos básicos. **A)** La secreción de citoquinas supresoras, que incluyen IL-10, IL-35 y TGF-β. **B)** La citólisis dependiente de perforinas y granzimas. **C)** La disrupción metabólica que abarca la deprivación de IL-2 mediante el secuestro por parte de CD25, la producción de adenosina con propiedades inmunosupresoras a través de la acción de las ectoenzimas CD39 y CD73, y la transferencia de AMP cíclico (AMPc) a través de uniones tipo "gap". **D)** La inhibición por contacto se produce gracias a la expresión de receptores inhibitorios como CTLA-4 (se une a CD80/86) y LAG-3 (se une con alta afinidad al CMH clase II) por parte de las células Treg. La unión de CTLA-4 también puede inducir la expresión de IDO en las células dendríticas (CD). Adaptado de Vignali y colaboradores [84].

activación, las células Treg pueden suprimir respuestas inmunes no relacionadas, es decir, en una forma no antígeno-específica, fenómeno conocido como supresión “bystander” [88].

Con respecto al fenotipo de las células Treg, se conoce que estas células pueden presentar en su superficie una gran variedad de moléculas que participan en su desarrollo y en los diferentes mecanismos de función supresora. Así, las células Treg se caracterizan por la expresión constitutiva de CD25, FR4, CTLA-4, GITR e ICOS, y la expresión variable de CD39, CD73 y OX40 entre otros marcadores (tabla 1). Sin embargo, ninguna de estas moléculas es específica para células Treg ya que pueden ser expresadas por linfocitos T activados. Se ha descrito que el incremento en los niveles de expresión de estas moléculas de superficie resulta en un estado de activación de las células Treg que promueve su función supresora *in vitro* e *in vivo*, y que puede ser gatillado en condiciones homeostáticas o bajo diferentes contextos inflamatorios [89-93].

Por otra parte, para ejercer adecuadamente su actividad supresora, las células Treg deben localizarse en proximidad física de las células blanco a las cuales controlan. Para ello, las células Treg expresan diferentes moléculas de adhesión y receptores de quemoquinas que les permiten migrar y acceder a variados microambientes (tabla 1). En este sentido, de acuerdo al perfil de expresión de diferentes marcadores de migración, se pueden distinguir células Treg “centrales” (CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup>) y células Treg “efectoras” (CD62L<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD103<sup>+</sup> KLRG1<sup>+</sup>). Las primeras recirculan a través de órganos linfoides y sangre, y son importantes para inhibir la fase de inducción de respuestas T en estos órganos, mientras que las células Treg “efectoras” se ubican inicialmente en órganos linfoides, donde encuentran a su antígeno específico, para luego migrar a tejidos no linfoides, cumpliendo allí funciones supresoras en el progreso y la resolución del proceso inflamatorio [91, 94-97].

Sumando complejidad a este modelo de heterogeneidad en la población de células Treg, más recientemente se describió la polarización funcional de estas células de acuerdo al tipo de inflamación presente. Así, durante esta especialización, diferentes señales inflamatorias inducen en las células Treg la expresión del factor de transcripción maestro asociado al perfil de respuesta que deben controlar. Por ejemplo, para limitar la inflamación tipo 1, las células Treg upregulan la expresión de T-bet, el factor de transcripción característico de linfocitos Th1, en respuesta a IFN- $\gamma$  y/o IL-27 producidos

por el microambiente inflamatorio [98, 99]. Esta expresión de T-bet en células Treg dirige un programa transcripcional determinado, que se caracteriza por la expresión concomitante del receptor de quemoquinas CXCR3, entre otras moléculas (tabla 1). De esta forma, la especialización funcional de las células Treg en contextos inflamatorios modifica las propiedades migratorias y homeostáticas de estas células, permitiendo que ejerzan un control efectivo de las respuestas inflamatorias.

Otro elemento de complejidad funcional es aportado por la existencia de poblaciones de células Treg residentes de tejido que presentan características particulares y que serían críticas para la regulación de procesos no-inmunológicos. Así, las células Treg de tejido adiposo participarían en el metabolismo y la obesidad, mientras que las células Treg residentes de músculo esquelético estarían involucradas en la regeneración y fibrosis [100-102].



Marcador		Descripción	Referencias
Proteína	Gen		
Foxp3	<i>Foxp3</i>	Factor de transcripción, regulador maestro necesario para la diferenciación y función de células Treg.	[53, 54, 103, 104]
CD25	<i>Il2ra</i>	Cadena alfa de alta afinidad del receptor de IL-2.	[105, 106]
CTLA-4	<i>Ctla4</i>	Molécula co-inhibitoria que compite con CD28 por la unión con CD80/CD86 de células presentadoras de antígenos e induce la expresión de IDO.	[107-110]
GITR	<i>Tnfrsf18</i>	Receptor de la superfamilia de TNF con función supresora mediante la unión a su ligando GITRL expresado en células blanco.	[111, 112]
FR4	<i>Folr4</i>	Receptor de ácido fólico.	[113]
CD39	<i>Entpd1</i>	Ectoenzima expresada en la superficie celular que degrada el ATP extracelular a AMP.	[114, 115]
CD73	<i>Nt5e</i>	Ectonucleotidasa expresada en la superficie celular que degrada el AMP extracelular a Adenosina. Actúa en conjunto con CD39.	[115, 116]
LAG-3	<i>Lag3</i>	Homólogo de CD4 con alta afinidad de unión a moléculas del CMH clase II de células dendríticas, inhibe su activación.	[117-119]
OX40	<i>Tnfrsf4</i>	Receptor de la superfamilia de TNF que ejerce actividad inhibitoria al unirse con su ligando OX40L expresado en células blanco.	[120-122]
PD-1	<i>Pdcd1</i>	Receptor inhibitorio. Se expresa en la superficie de células Treg activadas y se une a sus ligandos PD-L1 y PD-L2 expresados en células blanco.	[123, 124]
CD127	<i>Il7r</i>	Cadena alfa del receptor de IL-7.	[125, 126]
GARP	<i>Lrrc32</i>	Proteína transmembrana que se asocia al complejo TGF- $\beta$ latente en la superficie celular, actuando como punto de anclaje que regula la secreción de TGF- $\beta$ maduro.	[127-129]
LAP	<i>TGFb1</i>	Componente del complejo TGF- $\beta$ 1 latente.	[128, 130, 131]
IL-10	<i>Il10</i>	Citoquina con propiedades anti-inflamatorias.	[132-134]
CD62L	<i>Sell</i>	L-selectina, molécula de adhesión que participa en la migración de linfocitos a ganglios.	[95, 135-137]
CD44	<i>Cd44</i>	Receptor de ácido hialurónico, molécula de adhesión que incrementa su expresión luego de la activación de leucocitos e interviene en el proceso de "rolling".	[138, 139]
CCR7	<i>Ccr7</i>	Receptor de quemoquinas involucrado en la migración de linfocitos a ganglios y bazo.	[135, 137]
CD103	<i>Itgae</i>	Integrina $\alpha_E$ , su expresión en linfocitos es importante en la migración celular a tejidos no linfoides.	[96, 140, 141]
KLRG-1	<i>Klrg1</i>	Receptor inhibitorio. Se expresa en células T activadas.	[142, 143]
T-bet	<i>Tbx21</i>	Factor de transcripción, regulador maestro de la diferenciación de células Th1.	[98]
CXCR3	<i>Cxcr3</i>	Receptor de quemoquinas involucrado en la migración linfocitaria durante respuestas Th1.	[98]
IFN- $\gamma$	<i>Ifng</i>	Citoquina producida en procesos de inflamación tipo 1.	[99, 144, 145]

**Tabla 1: Principales marcadores de función supresora, migración, fenotipo central/efector y polarización expresados por las células Treg.**

### *Células T regulatorias en infecciones*

Durante un proceso infeccioso, la regulación de la respuesta inmune surge como una respuesta del hospedador a fin de mantener o restaurar la homeostasis y así limitar el daño colateral a los tejidos, o puede ser activamente inducida por el patógeno para evadir la respuesta inmune efectora y favorecer su sobrevivencia durante períodos de tiempo más prolongados [69, 88]. Muchos patógenos desarrollaron a lo largo de su evolución diversas estrategias que les permiten manipular la respuesta inmune del hospedador en su beneficio, incluyendo la inducción de respuestas regulatorias que normalmente se asocian a la fase de resolución de la reacción inflamatoria. Particularmente para las células Treg, los patógenos pueden promover su función supresora, su sobrevivencia y proliferación, y su reclutamiento y retención en los sitios de infección. De esta forma, en ciertas ocasiones el control de las células Treg durante una infección puede establecer un equilibrio entre el patógeno y su hospedador que es beneficioso para ambos. En otras ocasiones, la supresión ejercida por las células Treg es excesiva, previniendo el desarrollo de respuestas efectoras y permitiendo que el patógeno se replique sin restricción, lo cual compromete la sobrevivencia del hospedador. En el extremo opuesto, la respuesta regulatoria que se induce puede no ser suficiente para prevenir el desarrollo de inmunopatología en el hospedador [88]. En cualquiera de estos últimos casos, la manipulación de la respuesta regulatoria se vislumbra como una alternativa terapéutica en beneficio del hospedador.

La mayoría de los estudios que llevaron a estas conclusiones se realizaron en modelos de infecciones crónicas, que generalmente se asocian con un aumento en los números de las células Treg como consecuencia de la expansión de células tTreg y/o la inducción de células pTreg [76]. Por el contrario, el rol de las células Treg durante las infecciones agudas y en la fase aguda de las infecciones crónicas, aún no está completamente esclarecido o es controversial, e incluso es probable que las células Treg exhiban roles diferentes de acuerdo a la etapa en la que se esté evaluando su función. Sin embargo, se cree que durante las infecciones agudas las células Treg tendrían efectos beneficiosos al regular el reclutamiento de leucocitos a ganglios y sitios de infección, suprimir la proliferación de células infectadas y favorecer la generación de memoria inmunológica al incrementar el tiempo de disponibilidad de los antígenos [69, 146]. En contraste, se ha demostrado que en las infecciones producidas por *Toxoplasma gondii*,

*Listeria monocytogenes* y Virus Vaccinia, el establecimiento de respuestas Th1 potentes y la protección del hospedador requiere que disminuyan los números de células Treg [147, 148]. En estos casos, uno de los mecanismos descritos como causa de la disminución de la respuesta regulatoria es la falla en la generación de células Treg a partir de linfocitos T convencionales (Tconv, definidos como CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup>), lo que ha llevado a proponer que el ambiente altamente inflamatorio que prevalece durante las infecciones agudas impide la generación de células pTreg.

#### *Células T regulatorias en la infección por Trypanosoma cruzi*

Como se mencionó previamente, durante la enfermedad de Chagas se detectaron niveles incrementados de linfocitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> en sangre periférica de pacientes chagásicos con la forma indeterminada en relación a pacientes con manifestaciones graves. La mayor frecuencia de células con fenotipo Treg se correlacionó con un menor porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados, sugiriendo que la expansión de las células regulatorias puede ser un mecanismo que limita la activación de células efectoras y evita el daño tisular responsable de la inmunopatología chagásica [48]. De forma similar, otros estudios de correlación con pacientes chagásicos han sugerido que las células Treg tienen un papel protector en esta infección previniendo el desarrollo de inmunopatología [149-151].

Por el contrario, hasta el inicio de este trabajo de tesis, los estudios utilizando modelos experimentales de la infección con *T. cruzi* muestran resultados contradictorios e incluso opuestos. En este sentido, se ha sugerido que las células Treg tienen un papel protector [152], limitado [153] irrelevante [154] e inclusive deletéreo [155] durante esta infección. En todos los casos, las conclusiones obtenidas con los modelos murinos se basaron en experimentos de eliminación de células Treg utilizando anticuerpos específicos para moléculas de superficie (CD25 y GITR) que no son exclusivas de esta población celular y que han mostrado importantes limitaciones en otras infecciones parasitarias [156]. En este contexto, mayores estudios son necesarios para comprender el papel de las células Treg durante esta infección parasitaria y plantear posibles estrategias de inmunointervención.

## Antecedentes del grupo de trabajo

En los años precedentes, el grupo de trabajo se centró en estudiar el papel de la familia de citoquinas IL-17 en la progresión de la infección por *T. cruzi*. Así, se reportaron hallazgos que desafiaron el concepto tradicional de que IL-17 es una citoquina pro-inflamatoria, al evidenciar que la señalización vía IL-17RA es necesaria para controlar una inflamación exacerbada durante la infección con *T. cruzi*. El estudio de los mecanismos protectores involucrados indica que los efectos de las citoquinas IL-17 dependen tanto de la modulación de la respuesta inmune innata como de la adaptativa. En este sentido, se describió un mecanismo de regulación que involucra neutrófilos supresores productores de IL-10, demostrando que las citoquinas de la familia de IL-17 juegan un papel protector clave durante la infección con este parásito al prevenir la inflamación exacerbada, el daño en órganos vitales y la muerte del hospedador [157]. Por otro lado, se demostró que las citoquinas de la familia de IL-17 actúan de forma directa sobre los linfocitos T CD8<sup>+</sup> regulando su sobrevida, activación y agotamiento, potenciando una respuesta citotóxica robusta que favorece el control del parásito en tejidos [158].

Además, se demostró que las células B son una fuente inesperada de IL-17 durante la infección por *T. cruzi*, describiendo las vías de señalización intracelular implicadas [159]. En concordancia con los resultados anteriores, la IL-17 producida por los linfocitos B tiene un papel protector que se correlaciona con la regulación de la respuesta inflamatoria durante esta infección parasitaria. Por otro lado, se comprobó que las células B también controlan la respuesta de citoquinas pro-inflamatorias y de linfocitos T CD4<sup>+</sup> efectores, restringiendo la producción de TNF y favoreciendo la sobrevida de animales infectados con *T. cruzi* [160].

En conjunto estos resultados colaboran a la comprensión de las respuestas inmunes regulatoria y citotóxica durante la infección con *T. cruzi* y demuestran que la respuesta regulatoria y el control de la inmunopatología son factores críticos en la susceptibilidad frente a la infección con *T. cruzi*. Los hallazgos descriptos llevaron a profundizar el estudio de los mecanismos regulatorios, proponiendo así en este trabajo de tesis el análisis exhaustivo de la respuesta de células Treg durante esta infección.

# HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y MODELO EXPERIMENTAL



## Hipótesis

Las características de la respuesta inmune generada contra un microorganismo determinan no sólo la resistencia a la infección sino también el posible desarrollo de patología asociada a dicho patógeno. Por ello, frente a una infección es necesario que se generen respuestas inmunes efectoras vigorosas que permitan la eliminación del microorganismo, pero que sean controladas y autolimitadas para evitar daños a los tejidos del hospedador. Durante la infección con *T. cruzi*, la respuesta inmune efectora juega un papel crítico en la protección. No obstante, la producción exacerbada de citoquinas pro-inflamatorias ha sido asociada tanto a la susceptibilidad de la infección como al desarrollo de inmunopatología. En este sentido, los resultados previos de nuestro grupo de investigación y de otros autores, indican que la regulación de la respuesta efectora sería beneficiosa en esta infección para evitar el daño tisular y la muerte del hospedador. En este contexto, la hipótesis de este trabajo es que las células Treg tienen un rol importante en el control de las respuestas efectoras durante la infección con *T. cruzi*, previniendo de esta forma el desarrollo de daño tisular y favoreciendo la resistencia a la infección.

## Objetivo general

Evaluar los mecanismos regulatorios que operan durante la infección con *T. cruzi* analizando su correlación con el desarrollo de respuestas efectoras y la progresión de la infección.

## Objetivos específicos

- 1) Examinar el desarrollo de la respuesta de células T regulatorias Foxp3<sup>+</sup> durante la infección con *T. cruzi* analizando su correlación con el desarrollo de respuestas efectoras.

- 2) Evaluar el efecto de la manipulación del desarrollo de la respuesta de células T regulatorias Foxp3<sup>+</sup> en la progresión de la infección con *T. cruzi*.

## Modelo experimental

El estudio de los mecanismos que se ponen en juego en la defensa frente a patógenos comprende un área extensa dentro del campo de la inmunología. Si bien el análisis de la respuesta inmune en pacientes que cursan diversas infecciones aporta datos invaluable, gran parte de los estudios son llevados a cabo en modelos animales, principalmente en ratones, debido a las ventajas que esto supone en cuanto a la obtención de muestras, el control del modelo infectivo y la disponibilidad de organismos genéticamente modificados. Es así que el presente trabajo de tesis fue realizado utilizando ratones, principalmente ratones Foxp3-GFP como modelo animal.

Los ratones Foxp3-GFP son animales transgénicos que co-expresan el factor de transcripción Foxp3 y la proteína fluorescente verde (GFP). En estos animales, las secuencias codificantes para ambas proteínas se encuentran bajo el control de elementos promotores y enhancers endógenos del gen de Foxp3, y, al estar separadas por una secuencia IRES (“internal ribosomal entry sequence”) de unión al ribosoma, se traducen como dos proteínas individuales [161]. De esta forma, la síntesis de dos proteínas separadas en lugar de una proteína de fusión, permitiría conservar todas las secuencias de aminoácidos en la molécula de Foxp3 necesarias para su unión tanto al ADN como a otros factores de transcripción y proteínas, sin alterar por lo tanto su función. Por otro lado, los ratones Foxp3-GFP son fértiles y exhiben un desarrollo normal de células B y T [161]. Teniendo en cuenta que Foxp3 es un factor de transcripción con localización nuclear, su co-expresión con GFP permite entonces la identificación precisa y específica de la población de células Treg, de forma sencilla mediante técnicas de citometría de flujo o de inmunofluorescencia, evitando la realización de fijaciones y permeabilizaciones. Asimismo, mediante la identificación de GFP, junto con la tinción de superficie de CD4, es posible purificar específicamente la población de células Treg a través de “cell sorting”, y utilizar las células recuperadas para estudios donde es necesaria la viabilidad celular, como estudios funcionales o cultivos primarios.








Con respecto al modelo de infección, los animales se infectaron en forma intraperitoneal con 5000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*. La cepa Tulahuén fue aislada de pacientes chagásicos chilenos, y de acuerdo a su genotipificación, corresponde a la DTU (“discrete typing unit”) VI [162]. Este modelo de infección experimental fue puesto a punto previamente por el grupo de trabajo en ratones C57BL/6 WT [157], y genera una infección sistémica en la cual la mayoría de los ratones sobreviven a la etapa aguda de la infección y progresan a la cronicidad. La fase aguda en ratones WT se caracteriza por parasitemias moderadas, con un pico aproximadamente al día (d) 20 post-infección (pi), y una respuesta inflamatoria capaz de controlar los niveles de parásitos en sangre, que se tornan indetectables al d30pi [157]. La presencia del parásito también se detectó en órganos como bazo, hígado y corazón durante la fase aguda, presentando en bazo un pico al d14pi y siendo casi indetectable al d130pi, momento que corresponde a una etapa crónica temprana. Con respecto al daño tisular en este modelo, la fase aguda en ratones WT se caracterizó por daño hepático, que consistió en el desarrollo de necrosis y lesiones celulares moderadas entre los días 10 y 32 pi, con presencia de un gran infiltrado inflamatorio compuesto mayormente por células polimorfonucleares, y un aumento importante en los niveles plasmáticos de las transaminasas GOT y GPT al d20pi [157].

Durante el presente trabajo de tesis, se abordó el estudio de las células Treg durante la fase aguda la infección por *T. cruzi*. Así, de acuerdo al protocolo específico para cada experimento, los ratones Foxp3-GFP u otras cepas de animales detalladas más adelante, se infectaron y fueron sacrificados a distintos días post-infección para el análisis del desarrollo de la respuesta inmune en diferentes órganos. Adicionalmente, se realizaron estudios periódicos en sangre de la evolución de poblaciones leucocitarias y de distintos parámetros relacionados a la progresión de la infección, así como de la sobrevivencia de los ratones. En general, se utilizaron como control ratones no infectados de la misma edad y sexo que aquellos que sí lo estaban.



# RESULTADOS I

## CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE CÉLULAS T REGULATORIAS EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *T. CRUZI*

-  Cinética de desarrollo de células T regulatorias durante la infección con *T. cruzi*
-  Cinética de progresión de la infección y desarrollo de la respuesta inmune efectora anti-parasitaria: correlación con la respuesta de células T regulatorias
-  Mecanismos responsables de la reducción de la frecuencia de células T regulatorias en la etapa aguda de la infección por *T. cruzi*
-  Caracterización fenotípica, transcripcional y funcional de las células T regulatorias durante la infección con *T. cruzi*
-  Conclusiones



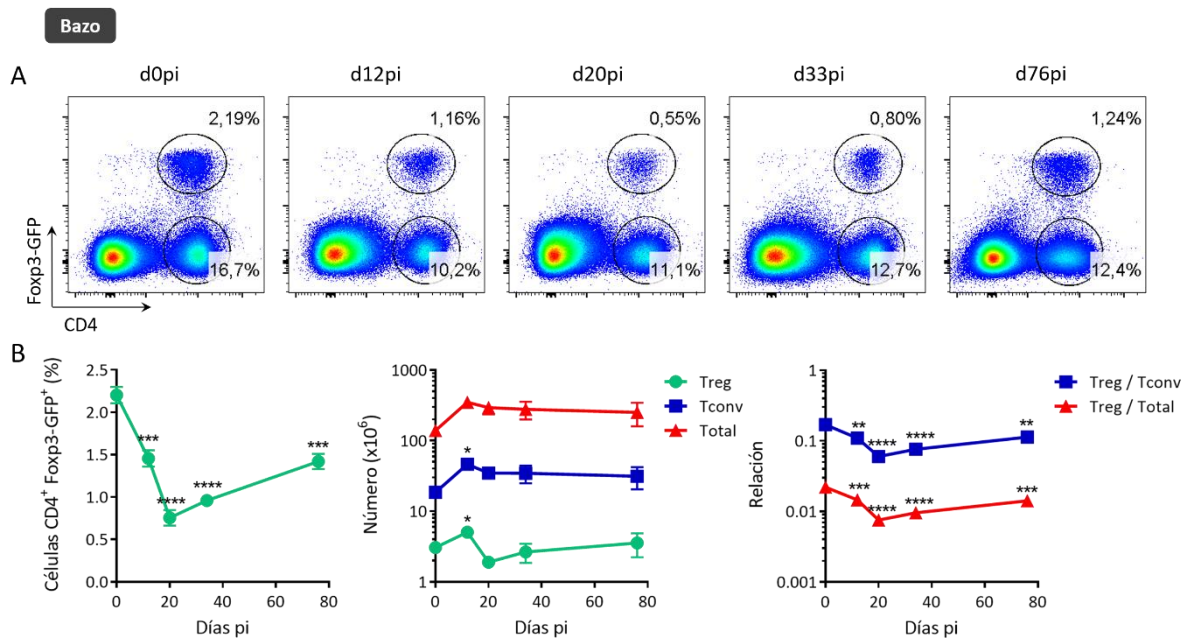
## Cinética de desarrollo de células T regulatorias durante la infección con *T. cruzi*

Los números de células Treg son determinantes cruciales de la capacidad reguladora del sistema inmune [97]. Sin embargo, hasta el inicio de este trabajo de tesis, ningún estudio llevado a cabo en modelos experimentales efectuó una descripción detallada de los números de células Treg a lo largo de la infección con *T. cruzi*. En este sentido, como primera aproximación al estudio de la respuesta reguladora durante esta infección, se analizó la evolución de los números de células Treg a lo largo de la progresión de la etapa aguda, así como su relación con el desarrollo de poblaciones celulares efectoras de la respuesta inmune frente a la infección. Para ello, ratones Foxp3-GFP se infectaron de acuerdo al modelo previamente descrito, y, a distintos tiempos post-infección, se determinó mediante citometría de flujo la frecuencia y los números absolutos de las poblaciones celulares bajo estudio presentes en órganos linfáticos primarios y secundarios, así como también en hígado. Los tiempos post-infección analizados fueron elegidos de manera de abarcar tanto la etapa aguda temprana como la tardía. La identificación de la población de células Treg en los diferentes órganos estudiados fue posible debido a la co-expresión de Foxp3-GFP y CD4, mientras que también se distinguieron células T CD4<sup>+</sup> Foxp3-GFP<sup>-</sup>, denominadas células T convencionales (Tconv) y que corresponden a la población de células T colaboradoras o helper con función efectora.

A lo largo de este trabajo, el principal órgano linfoide utilizado para evaluar la respuesta inmune sistémica frente a *T. cruzi* fue el bazo. Como se observa en la figura 6, el porcentaje de células Treg esplénicas disminuye a medida que la infección avanza, llegando a un máximo de reducción de la frecuencia alrededor del d20pi (entre los días 18 y 25 pi; figura 6A y B panel izquierdo). A medida que la infección progresa, la frecuencia de células Treg se recupera paulatinamente, sin embargo, incluso en la fase aguda tardía (d76pi) el porcentaje de estas células se mantiene significativamente disminuido en comparación con animales no infectados (d0pi), siendo aproximadamente un 40% menor respecto a estos controles (figura 6A y B panel izquierdo).

A continuación, se analizaron los números absolutos de las poblaciones celulares de bazo. Así, se determinó que la disminución en la frecuencia de células Treg no es

## Resultados I



**Figura 6: La frecuencia de células Treg se reduce en bazo durante la infección aguda con *T. cruzi*.**

**A)** Gráficos de puntos de citometría de flujo de la expresión de Fxp3-GFP y CD4 en células de bazo de ratones Fxp3-GFP infectados con *T. cruzi* a diferentes días (d) post-infección (pi). Los números en el gráfico indican los porcentajes de Treg (CD4<sup>+</sup> Fxp3<sup>+</sup>) y Tconv (CD4<sup>+</sup> Fxp3<sup>-</sup>). **B)** Gráficos que muestran la frecuencia de células Treg; el número absoluto de células Treg, Tconv y leucocitos totales de bazo (Total); y la relación de células Treg a Tconv y a leucocitos totales de bazo. Como control se utilizaron animales no infectados (d0pi). Los datos son presentados como promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM), contando con un *n* de 3 a 11 animales según el dpi, y son representativos de 4 experimentos independientes. Los valores *p* fueron calculados mediante ANOVA de una vía, y posterior comparación múltiple de Dunnett. \* *p* < 0,05; \*\* *p* < 0,01; \*\*\* *p* < 0,001; \*\*\*\* *p* < 0,0001.

consecuencia de una reducción en los números absolutos de esta población celular, ya que estos se ven incrementados tempranamente al d12pi, pero posteriormente no exhiben una variación marcada respecto a los números en animales no infectados (figura 6B, panel medio). Es importante destacar que la capacidad regulatoria del sistema inmune está relacionada tanto al número de células Treg como al número de células sobre las cuales estas ejercen su capacidad supresora. De esta forma, la relación entre el número de células Treg respecto al de las poblaciones celulares susceptibles a la supresión constituye un parámetro biológicamente relevante. En este sentido, a continuación se determinaron los números absolutos de células Tconv y leucocitos totales de bazo, observándose que ambos valores experimentan un incremento considerable a lo largo de toda la fase aguda en comparación con animales no infectados (d0pi) (figura 6B, panel medio), tal como ha sido reportado [157, 163]. En consecuencia, al examinar la relación entre los números de células Treg y los números de células Tconv, y leucocitos totales de bazo, se observa una disminución muy marcada de las dos relaciones respecto

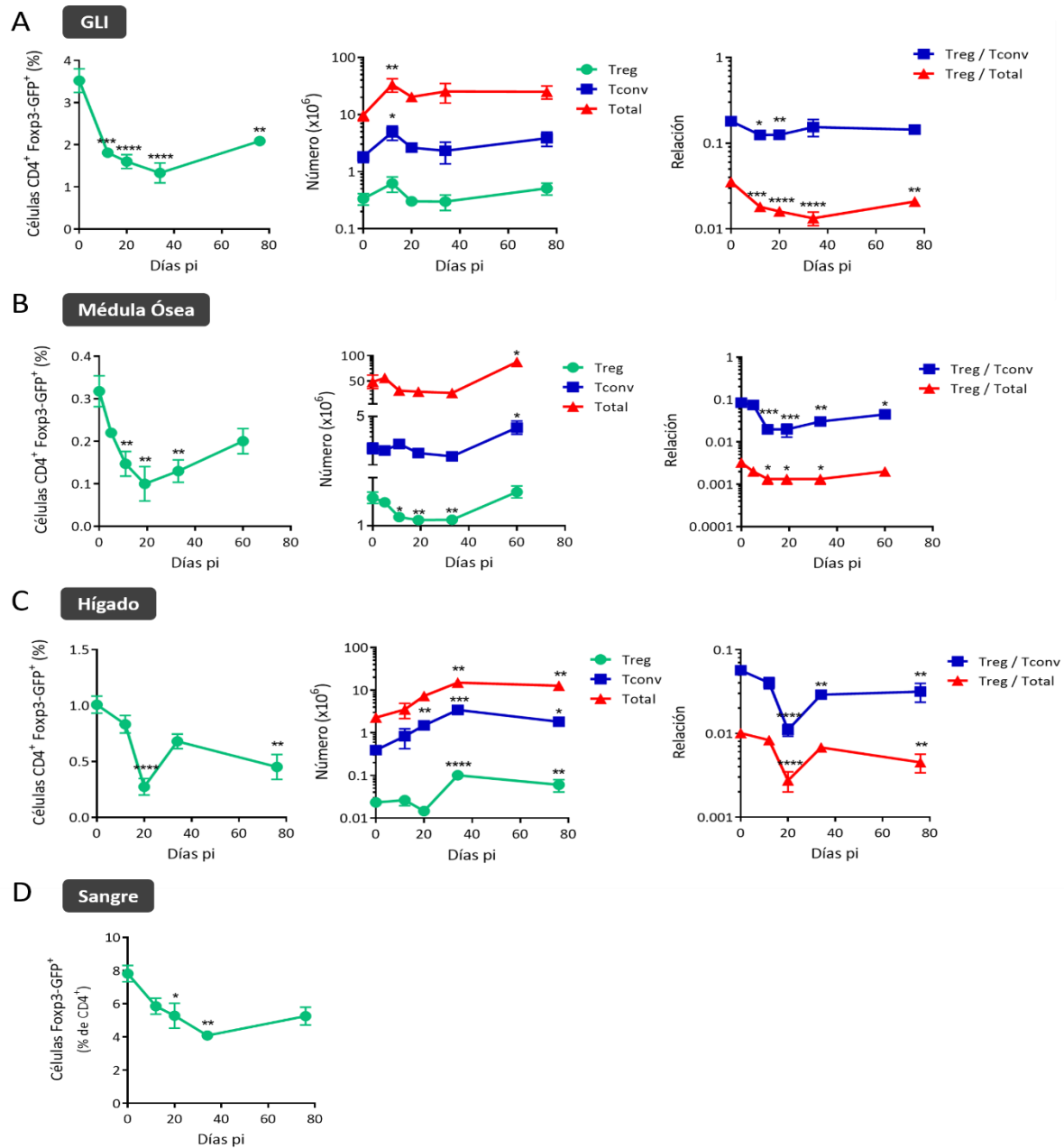
a la de los ratones no infectados a lo largo de la fase aguda, con un pico de reducción al d20pi (figura 6B, panel derecho). De esta forma, ambas relaciones exhiben un comportamiento de disminución similar al observado en la frecuencia de células Treg, sin restaurarse a niveles comparables a los hallados en animales no infectados, incluso al d76pi. En conjunto, estos resultados indican una disminución en la respuesta regulatoria en relación a su contraparte efectora tanto dentro de la población T CD4<sup>+</sup> como en la respuesta total luego de la infección con *T. cruzi*. Por otra parte, cabe destacar que el momento de la cinética en el que se observan los mayores cambios tanto en la frecuencia de células Treg como en las relaciones de estas células respecto a las otras poblaciones esplénicas, corresponde al d20pi y coincide con el momento en el que se observaron los mayores valores de parasitemia y el mayor daño hepático en los estudios previos llevados a cabo en ratones WT [157].

La disminución en la frecuencia de células Treg a lo largo de la fase aguda de la infección con *T. cruzi* no fue exclusiva de bazo, sino que también se observó en otros órganos y tejidos periféricos, como ganglios linfáticos inguinales (GLI) (figura 7A) y sangre (figura 7D), al igual que en médula ósea (figura 7B) y en infiltrado hepático (figura 7C). Es interesante notar que de forma similar a lo que ocurre en bazo, en GLI e hígado la disminución en la frecuencia de células Treg no es debida a una reducción en los números absolutos de esta población sino a un incremento en los números de células Tconv y totales de dichos órganos, resultando también en una marcada disminución de la relación de células Treg respecto a las poblaciones nombradas. Por el contrario, en médula ósea la disminución en la frecuencia de células Treg está ligada a una reducción en los números absolutos de esta población celular más que a cambios en los números de células Tconv y totales de este órgano, cuyo efecto final es también la caída en los valores de las relaciones de células Treg a Tconv y a células totales de médula ósea durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*.

Finalmente, la cinética del desarrollo de células Treg fue evaluada en órganos linfáticos asociados al desarrollo de esta población celular: ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) (sitio anatómico privilegiado para la inducción de células pTreg) y timo (órgano central para generación de células tTreg). Tanto en GLM como en timo se observa un perfil de evolución de la respuesta de células Treg diferente al descrito en los órganos analizados hasta el momento. Como se distingue en la figura 8A para GLM, la

## Resultados I

frecuencia de células Treg experimenta un aumento temprano al d12pi, que luego disminuye rápidamente, manteniéndose en niveles semejantes al de ratones no

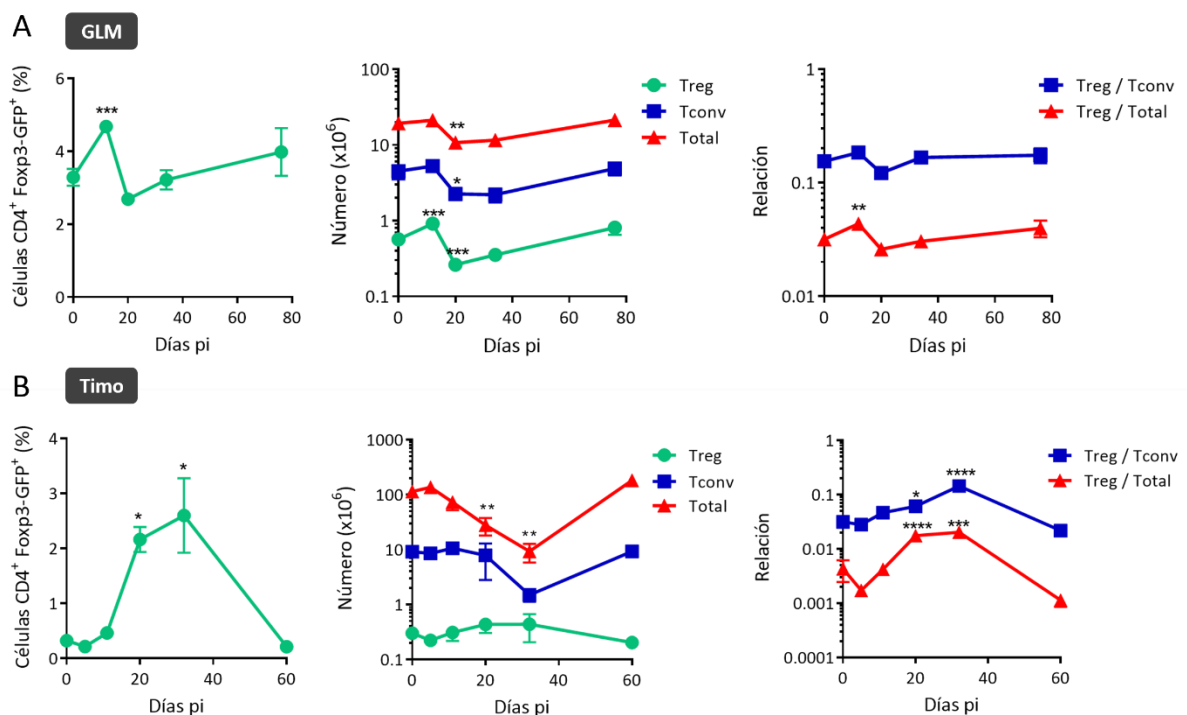


**Figura 7: La frecuencia de células Treg se reduce en periferia, médula ósea e hígado durante la infección aguda con *T. cruzi*.**

**A-D)** Gráficos que muestran la frecuencia de células Treg (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) en ganglio linfático inguinal (GLI) (A), médula ósea (B), infiltrado hepático (C) y sangre (D) de ratones Foxp3-GFP infectados con *T. cruzi* a diferentes dpi. Para los primeros tres órganos se muestra además el número absoluto de células Treg, Tconv y leucocitos totales del órgano; y la relación de células Treg a Tconv y a leucocitos totales. Como control se utilizaron animales no infectados (d0pi). Los datos son presentados como promedio ± EEM, contando con un n de 2 a 11 animales según el órgano y el dpi, y son representativos de 3 experimentos independientes para GLI e hígado, 2 para sangre y uno para médula ósea. Los valores p fueron calculados mediante ANOVA de una vía, y posterior comparación múltiple de Dunnett o el correspondiente análisis no paramétrico mediante test de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples de Dunn. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001.



infectados (d0pi) a lo largo de la fase aguda de la infección con *T. cruzi*. Al analizar los números absolutos, se puede deducir que las variaciones tempranas en GLM están dadas por cambios en el número absoluto de células Treg, ya que este aumenta al d12pi mientras que los números de células Tconv y células totales del ganglio no experimentan cambios en este momento respecto a los animales no infectados. Luego, a medida que la infección progresa hacia el d20pi, ocurre una merma abrupta en los números absolutos de células Treg. Esto se ve acompañado por una disminución también en los números de células Tconv y totales de GLM, indicando una marcada hipoplasia en este órgano y posibles defectos en la inducción de células pTreg al d20pi. Los números de células Treg, Tconv y totales del ganglio se restablecen a los valores normales más adelante en la infección, entre los días 34 y 76 pi. Como resultado de estas variaciones en los números de las diferentes poblaciones celulares, las relaciones de células Treg a Tconv y células



**Figura 8: La frecuencia de células Treg no se reduce en ganglios linfáticos mesentéricos y timo durante la infección aguda con *T. cruzi***

**A-B)** Gráficos que muestran la frecuencia de células Treg (CD4<sup>+</sup> Fxp3<sup>+</sup>); el número absoluto de células Treg, Tconv y leucocitos totales; y la relación de células Treg a Tconv y a leucocitos totales del órgano en GLM (A) y timo (B) de ratones Fxp3-GFP infectados con *T. cruzi* a diferentes dpi. Los datos son presentados como promedio de 2 a 16 animales  $\pm$  EEM, y son representativos de 3 experimentos independientes para timo, y 2 para GLM. Los valores p fueron calculados mediante ANOVA de una vía, y posterior comparación múltiple de Dunnett o el correspondiente análisis no paramétrico mediante test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001.

totales de GLM muestran un leve incremento inicial que rápidamente se restaura a valores semejantes al de ratones no infectados.

En cuanto al timo, se observa en la figura 8B que la frecuencia de células Treg en este órgano presenta un perfil opuesto al obtenido en órganos periféricos, con un aumento marcado de la misma entre los días 20 y 33 pi, y que luego, al d60pi, desciende a valores normales similares al de ratones no infectados. Al investigar los números absolutos de las diferentes poblaciones celulares, se puede inferir que los cambios en la frecuencia de células Treg no son producto de variaciones significativas en los números absolutos de esta población celular, ya que se mantienen relativamente constantes a lo largo de la fase aguda, sino que son producto de una marcada reducción en los números de células Tconv y timocitos totales. En consecuencia, las relaciones de células Treg a Tconv y a células totales del órgano exhiben un incremento significativo entre los días 20 y 33 pi. Es relevante aclarar que si bien los datos mostrados para células Treg y Tconv corresponden al total de timocitos CD4<sup>+</sup>, resultados equivalentes a estos se obtuvieron al analizar los timocitos CD4 simple positivos (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>) (datos no mostrados). La importante disminución que se observa en el número de timocitos durante la infección con *T. cruzi* es resultado de un proceso de atrofia tímica, el cual ha sido descrito previamente para esta infección [164], y ocurre como consecuencia de la apoptosis en masa de timocitos doble positivos (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) en respuesta al aumento en los niveles de glucocorticoides. Por otro lado, la ausencia de cambios en los números de células Treg en timo sugeriría que la generación de células tTreg no se ve afectada durante la infección con *T. cruzi*.

En conjunto, estos resultados indican que la infección por *T. cruzi* induce una deficiencia en los números de células Treg en relación a los de células Tconv y otras poblaciones de células efectoras del sistema inmune presentes en diferentes órganos periféricos. Además, la reducción de la frecuencia periférica de células Treg podría estar relacionada con defectos en la inducción de células pTreg en GLM, mientras que no parece ser consecuencia de defectos en la generación de células tTreg durante la infección.

## Cinética de progresión de la infección y desarrollo de la respuesta inmune efectora anti-parasitaria: correlación con la respuesta de células T regulatorias

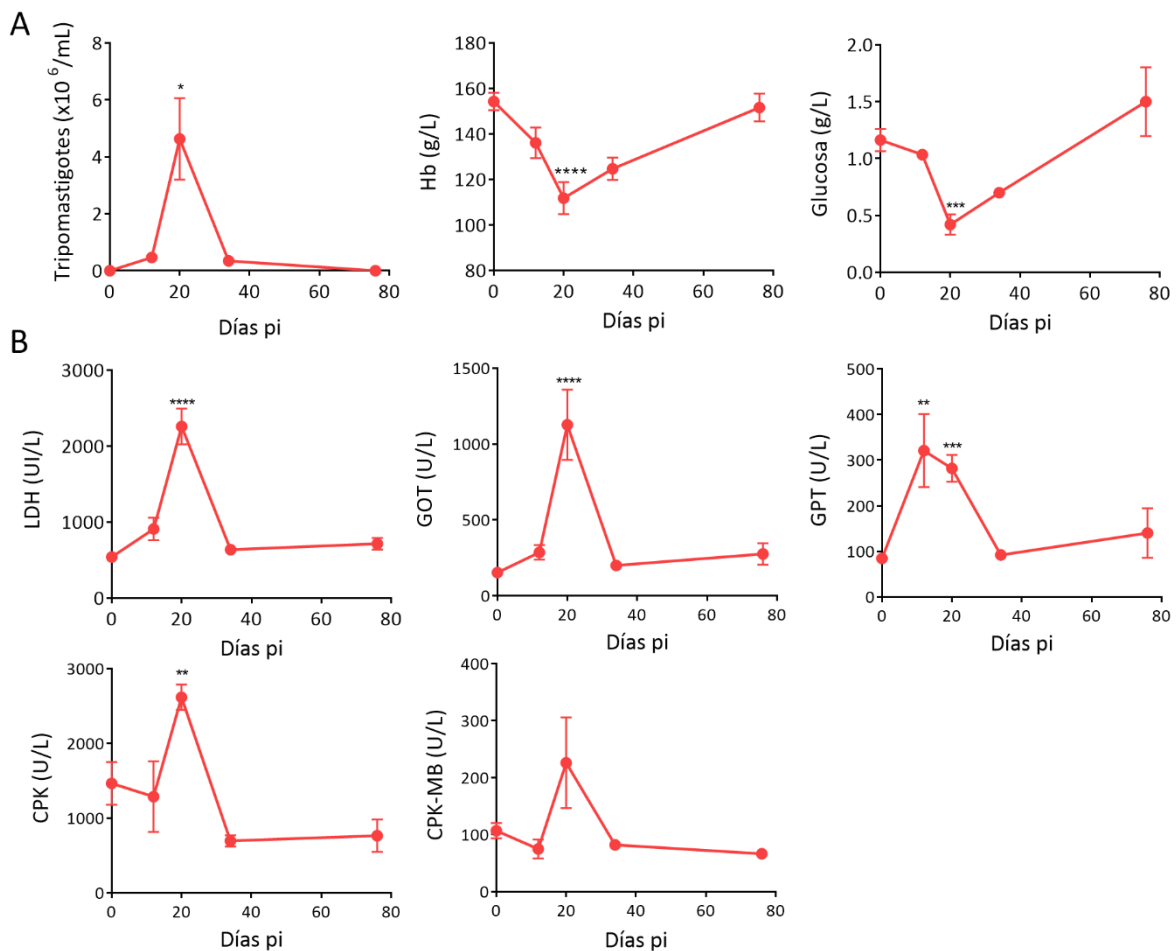
En la sección anterior se estableció que los números absolutos de células Treg no se modifican marcadamente mientras que, en conjunto, los números del resto de las células del sistema inmune aumentan en forma notable en la mayoría de los órganos periféricos estudiados a lo largo de la fase aguda de la infección con *T. cruzi*. Teniendo en cuenta que defectos en la respuesta regulatoria y respuestas inflamatorias exacerbadas han sido asociados al desarrollo de daño tisular y a la susceptibilidad a esta infección, a continuación se evaluó la progresión de la infección y el desarrollo tanto de la respuesta inflamatoria general como de la respuesta específica anti-parasitaria en nuestro modelo experimental en ratones Foxp3-GFP. Asimismo, se realizaron estudios de correlaciones a modo de determinar si el surgimiento de la respuesta efectora y la aparición de marcadores de daño tisular están asociados a la disminución en la frecuencia de células Treg en periferia.

### *Progresión de la infección*

Con el objetivo de examinar la progresión de la infección por *T. cruzi*, se analizaron diferentes parámetros en sangre y plasma sanguíneo de ratones Foxp3-GFP a diferentes tiempos post-infección. En primer lugar, se determinaron los niveles de parasitemia, como así también las concentraciones de hemoglobina y glucosa, indicadores de la evolución de la infección aguda [165, 166]. En segundo lugar, se cuantificó la actividad de diferentes enzimas plasmáticas que se estudian como marcadores bioquímicos de daño tisular. Así, se evaluaron LDH y GOT como marcadores de daño general, GPT como indicador de daño hepático, CPK como marcador de daño muscular, y por último la isoforma CPK-MB como indicador de daño cardíaco. Los niveles de actividad de GPT, CPK y CPK-MB resultaron especialmente relevantes de analizar debido a la susceptibilidad del hígado en la fase aguda [52, 157], y a la conocida afección muscular, en especial del tejido cardíaco, durante esta infección [10, 167, 168].

## Resultados I

Como se observa en la figura 9, todos los parámetros analizados variaron notablemente a lo largo de la etapa aguda, con picos en los niveles de sus concentraciones o actividades al d20pi. De importancia, la parasitemia comienza a elevarse lentamente hacia el d12pi, presentando un pronunciado incremento al d20pi, el cual resulta significativo respecto de animales no infectados (d0pi), y se torna luego indetectable al d76pi (figura 9A, panel izquierdo). Por otra parte, se observó una disminución marcada de los niveles de hemoglobina y glucosa, presentando ambos parámetros un pico de reducción significativo al d20pi en relación a animales no



**Figura 9: Cambios en los niveles de parasitemia y marcadores bioquímicos durante la progresión de la infección aguda con *T. cruzi*.**

**A-B)** Gráficos que muestran los niveles de parasitemia, concentración de hemoglobina (Hb) en sangre, y glucemia (A), y los niveles de actividad de las enzimas LDH, GOT, GPT, CPK y CPK-MB (B) medidos en plasma sanguíneo de ratones *Foxp3-GFP* a diferentes dpi. Los datos son presentados como promedio de 3 a 11 animales según el dpi ± EEM, y son representativos de dos experimentos independientes. Los valores p fueron calculados mediante ANOVA de una vía, y posterior comparación múltiple de Dunnett o el correspondiente análisis no paramétrico mediante test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001. (GOT= transaminasa glutámico-oxalacética, GPT= transaminasa glutámico-pirúvica, LDH= lactato deshidrogenasa, CPK= creatina fosfoquinasa, CPK-MB= creatina fosfoquinasa de miocardio y cerebro).

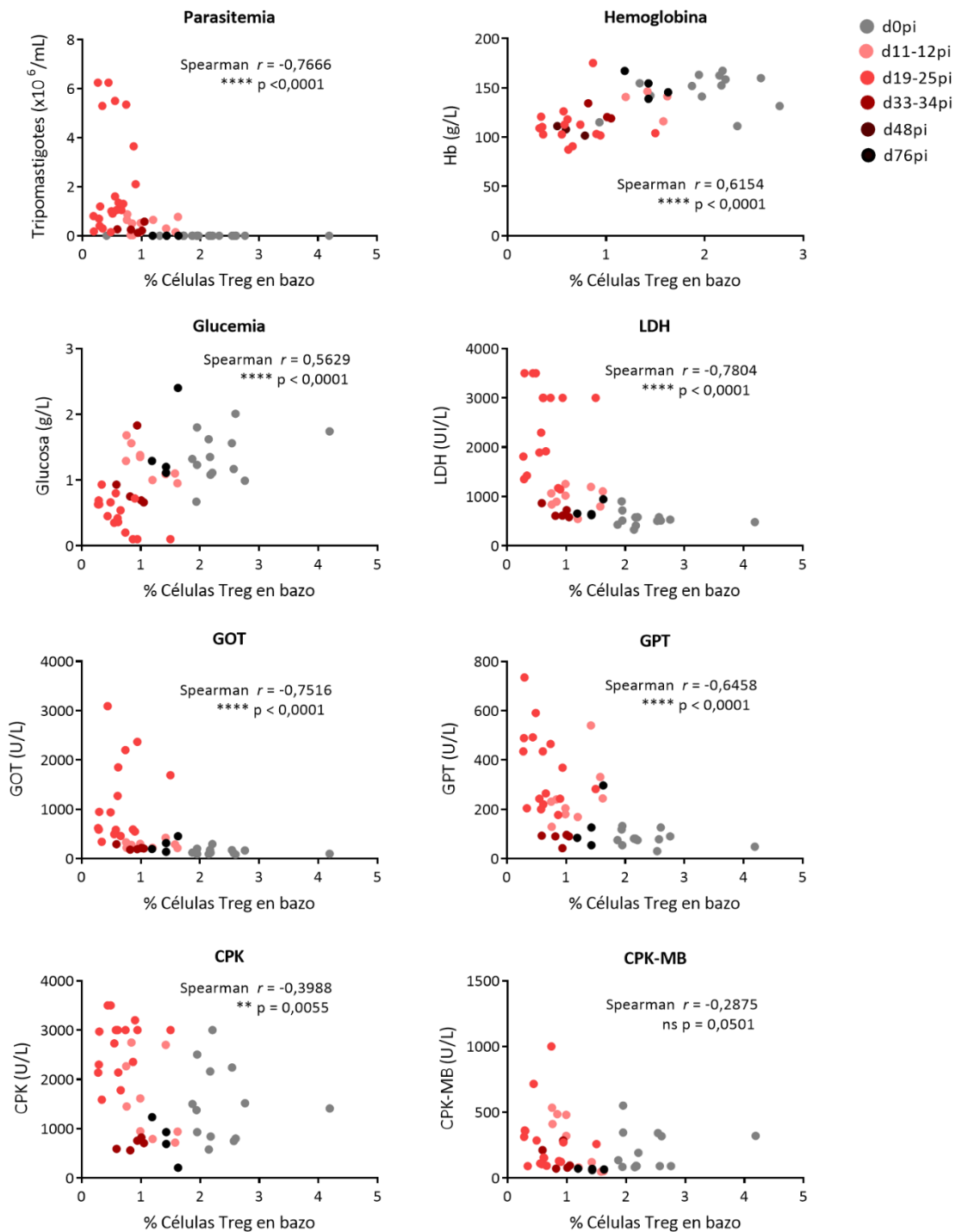
infectados, para luego alcanzar niveles comparables a los de animales no infectados hacia el d76pi (figura 9A, paneles medio y derecho, respectivamente). En cuanto a los marcadores bioquímicos de daño tisular, la actividad de todas las enzimas estudiadas muestra un aumento al d20pi, indicando un daño importante de tejidos en este momento de la infección aguda (figura 9B). Es relevante destacar que para el caso de GPT, el incremento en su actividad ya es significativo a partir del d12pi respecto de los valores en ratones no infectados, manteniéndose en niveles semejantes hasta el d20pi inclusive, lo cual sugiere que la función hepática se ve comprometida desde momentos tempranos en la infección aguda. Los resultados expuestos hasta el momento indican que el pico de la infección corresponde al d20pi para el modelo experimental utilizado, registrándose en este punto de la fase aguda los mayores niveles de parásitos circulantes así como los niveles más bajos de hemoglobina y glucosa en sangre, señalando un estado de salud comprometido de los ratones, al mismo tiempo que se detecta un importante daño tisular general y específico para hígado, músculo y corazón.

Teniendo cuenta que los mayores cambios en la carga parasitaria y en los marcadores bioquímicos de daño se observaron al d20pi, momento que coincide con el registro de las menores frecuencias de células Treg esplénicas, a continuación se determinó si la reducción en los porcentajes de estas células está asociada a las variaciones en los niveles de los diferentes parámetros de progresión de la infección estudiados. Para ello, se analizó la existencia de correlación estadística mediante el coeficiente de Spearman.

Como se observa en la figura 10, la mayoría de las asociaciones estudiadas muestran correlación, observándose asociaciones fuertes entre la frecuencia de células Treg esplénicas y el nivel de parasitemia y de actividad de LDH y GOT, asociaciones moderadas para los niveles de hemoglobina, glucemia, GPT y CPK, mientras que la asociación es débil para CPK-MB. Además, estas asociaciones son directas para el caso de la relación entre frecuencia de células Treg y la concentración plasmática de hemoglobina y glucosa, mientras que son inversas al relacionar dicha frecuencia con los niveles de parasitemia y la actividad plasmática de las enzimas. Por otra parte, los valores p calculados muestran que las asociaciones son significativas, a excepción de la relación entre la frecuencia de células Treg y el nivel de actividad de CPK-MB, que está muy cerca de serlo ( $p = 0,0501$ ). La significación de las correlaciones indica que la asociación

## Resultados I

encontrada no es consecuencia del azar. Sin embargo, dado que la existencia de correlación no implica una relación causa-efecto, la asociación entre las variables revela

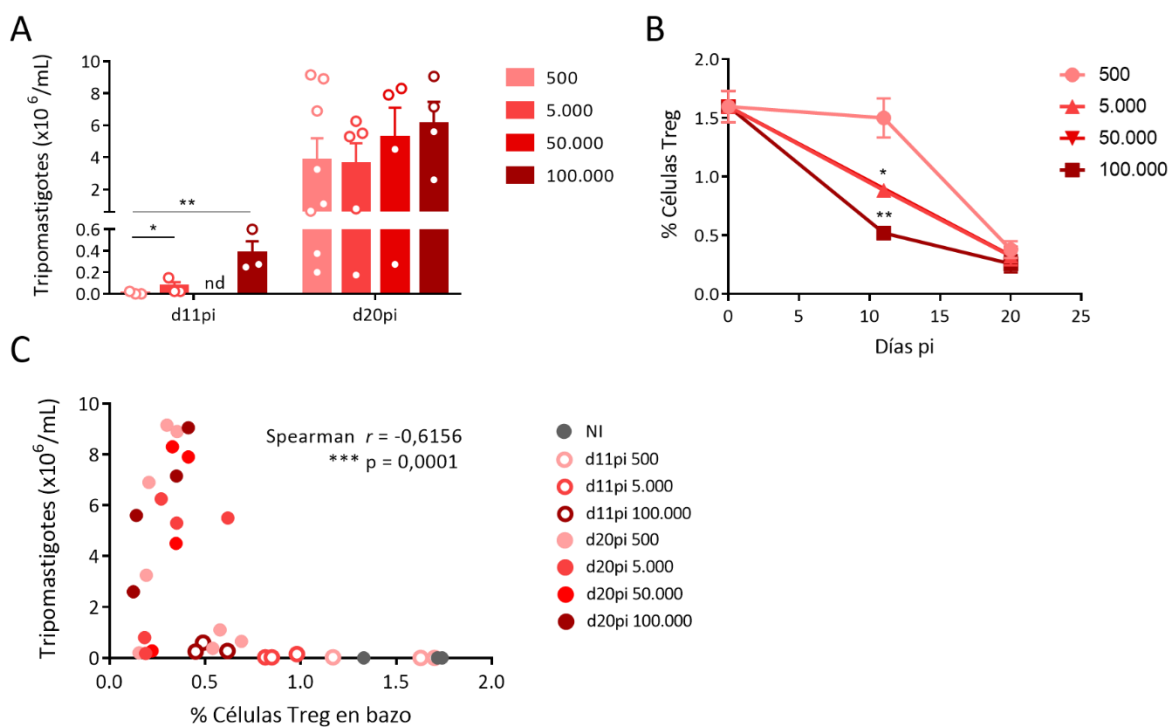


**Figura 10: La frecuencia de células Treg esplénicas se correlaciona con marcadores bioquímicos de progresión en la infección aguda con *T. cruzi*.**

Gráficos de dispersión que representan la relación entre la frecuencia de células Treg en bazo y los niveles de diferentes marcadores bioquímicos de progresión de la infección y daño tisular obtenidos en sangre o plasma sanguíneo de ratones Fxp3-GFP a diferentes dpi. Cada punto representa un animal. En cada gráfico se indica el coeficiente  $r$  de Spearman y la significación de la correlación. Los datos corresponden de 1 a 6 experimentos independientes según el dpi. ns = no significativo.

alguna de las siguientes tres posibilidades: que los cambios en el porcentaje de células Treg en bazo causen los cambios en los valores de marcadores bioquímicos de progresión de la infección, que los cambios en los marcadores bioquímicos causen los cambios en la frecuencia de células Treg, o que ambas variables estén determinadas por un tercer factor, causa de los cambios en ambas variables.

Considerando la alta correlación entre los niveles de parásitos en sangre con la frecuencia de células Treg en bazo, y con el objetivo profundizar sobre esta asociación, a continuación se llevaron a cabo experimentos de infección con diferentes dosis de *T. cruzi*. Así, ratones Fxp3-GFP se inocularon con cuatro dosis parasitarias: 500, 5.000 (dosis experimental utilizada a lo largo de este trabajo), 50.000 y 100.000 tripomastigotes, y se analizó la parasitemia y la frecuencia de células Treg en bazo a distintos tiempos post-infección. Como se observa en la figura 11A, si bien los ratones que se inocularon con



**Figura 11: El incremento de la dosis infectiva acelera la cinética de reducción de la frecuencia de células Treg durante la infección con *T. cruzi*.**

**A-B)** Gráficos que muestran los niveles de parásitos en sangre (A) y la frecuencia de células Treg en el bazo (B) de ratones Fxp3-GFP infectados con 500, 5.000, 50.000 ó 100.000 tripomastigotes o de controles no infectados (NI). **C)** Gráfico de dispersión que muestra la relación entre la frecuencia de células Treg en bazo y la parasitemia de los ratones en (A). Cada punto representa un animal. Se indica el coeficiente  $r$  de Spearman y la significación de la correlación. Los datos en (A) y (B) son presentados como promedio de 3 a 8 animales  $\pm$  EEM y corresponden a 1 ó 2 experimentos independientes según el dpi y la dosis infectiva. Los valores  $p$  fueron calculados mediante ANOVA de una vía, y posteriores comparaciones múltiples mediante test de Tukey. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . nd = no determinado. En (B) las estrellas indican el valor  $p$  para la comparación entre las dosis de 5.000 y 100.000 tripomastigotes respecto a la de 500 en el d11pi.

mayores dosis de parásitos presentaron mayores valores de parasitemia al d11pi, todos los grupos experimentales mostraron valores de parasitemia equivalentes hacia el d20pi. Al analizar la frecuencia de células Treg en estos ratones, se observó que al d11pi hay una mayor reducción en el porcentaje de células Treg en los grupos inoculados con mayores dosis parasitarias mientras que al avanzar la infección hasta el d20pi, todos los grupos experimentales exhiben la misma frecuencia reducida de células Treg (figura 11B). Así, estos resultados indican que un aumento en la dosis parasitaria de inoculación no genera una mayor reducción en la disminución de la frecuencia de células Treg sino una aceleración del proceso. Teniendo en cuenta que estos resultados sugieren, al igual que los anteriores, que los cambios en la frecuencia de células Treg están asociados a los niveles de parasitemia se estudió la asociación entre la parasitemia y la frecuencia de células Treg en estos animales. Se observó una correlación inversa con alta significancia entre estas variables (figura 11C).

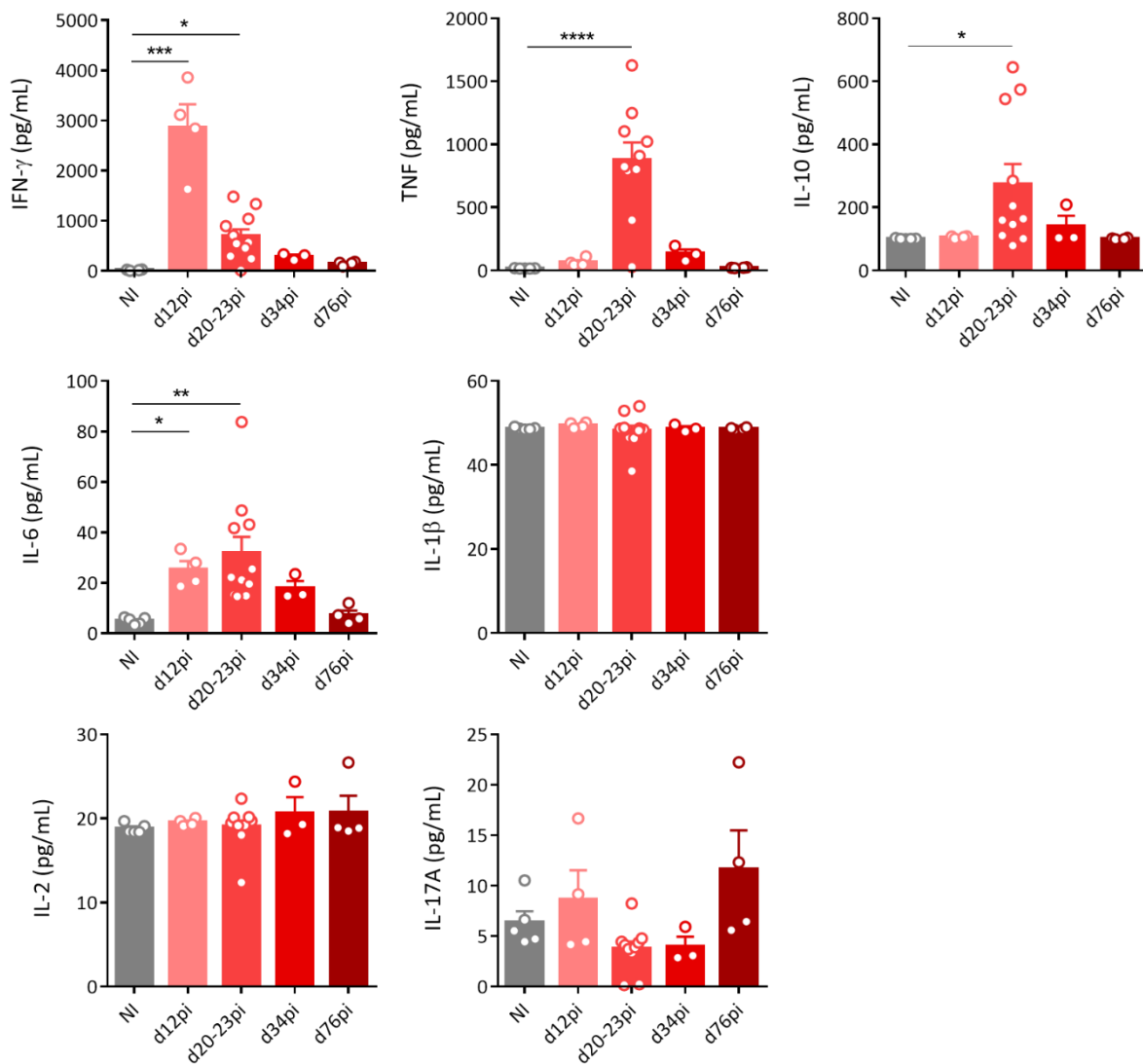
En conjunto, estos resultados indican que en nuestro modelo experimental de infección con 5.000 tripomastigotes de *T. cruzi* en animales Foxp3-GFP, ocurre un pico de parasitemia al d20pi, acompañado de una reducción significativa de la concentración plasmática de hemoglobina y glucosa, así como un marcado daño tisular dado por el incremento en la actividad plasmática de distintas enzimas. Asimismo se determinó que los cambios observados en las diferentes variables relacionadas a la progresión de la infección se encuentran asociados a los cambios en la frecuencia de células Treg esplénicas a lo largo de la fase aguda.

### *Respuesta sistémica de citoquinas pro- y anti-inflamatorias*

Una vez establecidas las asociaciones de la sección anterior, el siguiente paso consistió en examinar el desarrollo de la respuesta efectora en nuestro modelo de infección, estudiando la relación entre su surgimiento y la disminución de la frecuencia de células Treg en periferia. Para ello, en una primera instancia, se analizó la aparición de diversas citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a la infección aguda con *T. cruzi* (IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-17A, IL-17F e IL-21), al mismo tiempo que se determinaron los niveles de IL-10, a modo evaluar también la respuesta de citoquinas regulatorias. Así, se cuantificaron las concentraciones de dichas proteínas en el plasma de ratones Foxp3-GFP a diferentes tiempos de infección.



Como se observa en la figura 12, los incrementos en la concentración plasmática de citoquinas ocurrieron entre los días 12 y 23 pi, observándose tanto para citoquinas pro-inflamatorias como para IL-10. Las citoquinas que alcanzaron las mayores concentraciones fueron IFN- $\gamma$  y TNF, en menor medida IL-10, y a niveles aún menores IL-6. En particular, es interesante destacar la cinética de IFN- $\gamma$ , donde se advierte un marcado incremento temprano de esta citoquina al d12pi en comparación con los respectivos



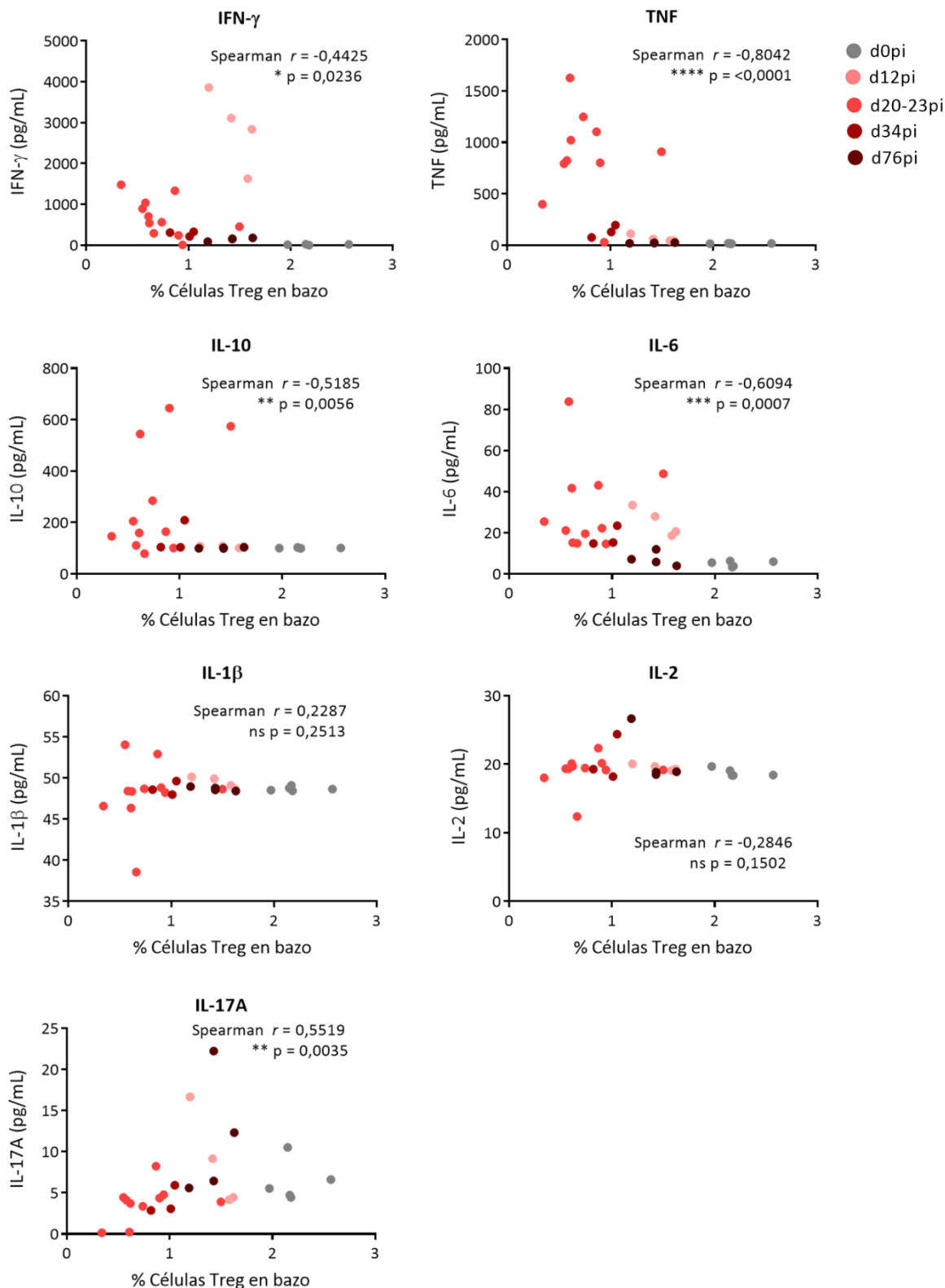
**Figura 12: La concentración plasmática de algunas citoquinas pro-inflamatorias y de IL-10 aumenta en la infección aguda con *T. cruzi*.**

Concentración de diferentes citoquinas en el plasma sanguíneo de ratones Foxp3-GFP a diferentes dpi o de animales no infectados (NI) como control. Los datos se graficaron representando el promedio de 3 a 11 animales según el dpi + EEM, y corresponden a un único experimento o a dos experimentos independientes en el caso del d20-23pi. Cada punto representa un animal. Los valores p fueron calculados mediante ANOVA de una vía, y posterior comparación múltiple de Dunnett o el correspondiente análisis no paramétrico mediante test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

valores basales de animales no infectados, para luego disminuir en forma pronunciada al d20-23pi, si bien aún en este punto su concentración está aumentada significativamente respecto a dichos controles. Por su parte, TNF e IL-10 alcanzan sus niveles máximos al d20-23pi, mientras que IL-6 comienza a aumentar al d12pi, alcanzando sus mayores valores al d20-23pi. En general, el resto de las citoquinas analizadas mostraron concentraciones que se mantuvieron bajas en respuesta a la infección y en niveles similares a los controles no infectados (IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-17A) o no alcanzaron valores detectables en ninguno de los tiempos de infección estudiados (IL-12, IL-17F e IL-21).

Posteriormente, se analizó si las variaciones descriptas en los niveles plasmáticos de citoquinas se asocian a los cambios observados en la frecuencia de células Treg esplénicas de estos ratones. Para ello se estudiaron las correlaciones correspondientes en forma similar a la sección anterior. Así, las variaciones en el porcentaje de células Treg esplénicas a lo largo de la infección se asoció significativa y fuertemente con los cambios en los niveles de TNF, y moderadamente con los de IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6 e IL-17A, mientras que no se correlacionó con los de IL-1 $\beta$  ni con los de IL-2 (figura 13). Estas correlaciones fueron inversas para IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10 e IL-6, en tanto que fue directa para el caso de la IL-17A.

Estos resultados indican que a lo largo de la infección hay un aumento en la concentración plasmática de citoquinas pro-inflamatorias, al igual que de la regulatoria IL-10, y que estos cambios están asociados a la reducción en la frecuencia de células Treg en bazo. De forma interesante, si bien los niveles de IL-17A no disminuyen significativamente con el curso de la infección, la concentración plasmática en cada animal se correlaciona directamente con la frecuencia de células Treg que este presenta en el bazo. En el sentido inverso, los niveles de IL-10 se correlacionaron indirectamente con la frecuencia de estas células. Considerando que la IL-2 es un factor de supervivencia para las células Treg y de proliferación general para linfocitos T, es relevante destacar que la concentración plasmática de esta citoquina mantiene valores bajos y comparables a los controles en todos los dpi analizados, y no se asocia con la disminución en la frecuencia de células Treg.



**Figura 13: La frecuencia de células Treg esplénicas se correlaciona con la concentración plasmática de citoquinas en la infección aguda con *T. cruzi*.**

Gráficos de dispersión que representan la relación entre la frecuencia de células Treg en bazo y la concentración de diferentes citoquinas en plasma sanguíneo de ratones Foxp3-GFP a diferentes dpi. Cada punto representa un animal. En cada gráfico se indica el coeficiente  $r$  de Spearman y la significación de la correlación. Los datos corresponden a 2 experimentos independientes para el d20-23pi, mientras que a un único experimento para el resto de los dpi. ns = no significativo

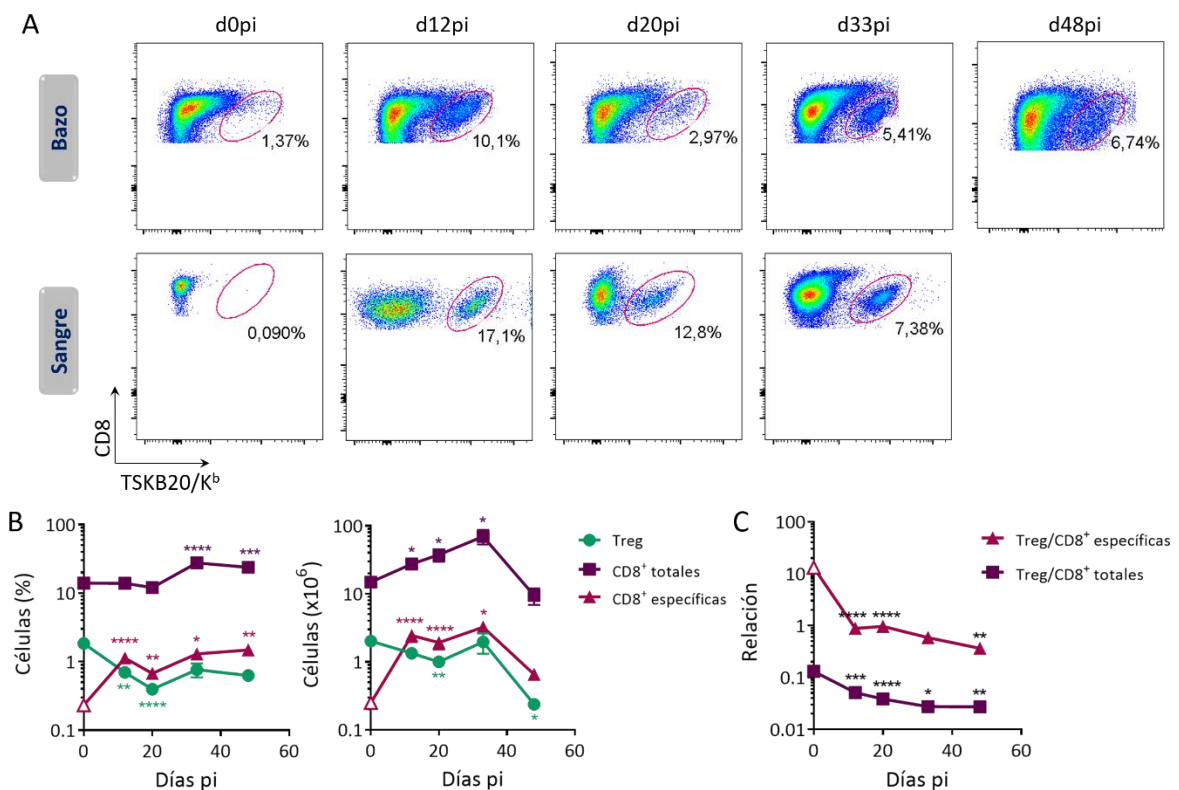
*Respuesta efectora específica antiparasitaria*

A modo de profundizar sobre la respuesta inmune efectora y su relación con el desarrollo de células Treg, se prosiguió a estudiar la evolución de la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> a lo largo de la infección con *T. cruzi*. Se conoce que la respuesta citotóxica es crítica para el control del parásito, y en la infección experimental, se caracteriza por una alta inmunodominancia dada por un gran porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para un pequeño número de péptidos, principalmente derivados de la superfamilia de proteínas *trans*-sialidasa del parásito [32, 169]. En particular para la fase aguda de la infección, se ha descrito que la dominancia de la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> está mayormente dirigida hacia el péptido TSKB20 de *trans*-sialidasa, incluso frente a diferentes cepas de *T. cruzi* [32]. Más aún, la presencia de un alto porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> específicas para TSKB20, pero no para otro péptido de *T. cruzi* en nuestro modelo infectivo, fue confirmada previamente en ratones WT por nuestro grupo de trabajo, distinguiéndose en la cinética de estas células las fases clásicas de activación (hasta el d10pi), expansión (entre los días 14 y 32pi) y contracción (a partir del d32pi) [158].

En este contexto, y a modo de poder estudiar de forma conjunta la evolución de la respuesta regulatoria y la respuesta citotóxica, se determinó mediante citometría de flujo la frecuencia de células Treg, T CD8<sup>+</sup> totales y T CD8<sup>+</sup> específicas para *T. cruzi* en ratones Foxp3-GFP a diferentes tiempos de infección. El estudio de linfocitos con TCR específicos por citometría de flujo es posible gracias al empleo de tetrámeros de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) marcados con fluorocromos y cargados con péptidos sintéticos, lo que permite la unión de estos constructos a aquellos linfocitos que expresan moléculas de TCR capaces de reconocer al péptido en cuestión [170, 171]. Así, para nuestro caso de estudio, los tetrámeros utilizados están compuestos por moléculas H2-K<sup>b</sup> (también llamadas simplemente K<sup>b</sup>) del CMH clase I de ratón cargadas con péptidos TSKB20 de *T. cruzi*.

De esta forma, y tal como se esperaba, se confirmó que al igual que en animales WT, los ratones Foxp3-GFP inducen una fuerte respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para el péptido TSKB20 en bazo y sangre periférica frente a la infección con *T. cruzi* (figura 14A). La frecuencia y los números absolutos de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos, así como los de células T CD8<sup>+</sup> totales en bazo, coinciden con una fase de expansión de la respuesta citotóxica desde el d12pi, que declina en sus números absolutos hacia el d48pi (figura

14B). En este sentido, dado que los números de células Treg disminuyen o no varían significativamente en estos ratones a medida que progresa la infección, mientras que los de linfocitos T CD8<sup>+</sup> esplénicos incrementan en comparación al d0pi, al analizar las relaciones entre los números absolutos de estas poblaciones celulares se observa una reducción marcada de células Treg respecto a linfocitos T CD8<sup>+</sup> parásito-específicos y totales en comparación con los controles no infectados, de forma similar a las relaciones calculadas previamente para células Tconv de bazo (figura 14C). A continuación, con el objetivo de determinar si la reducción en el porcentaje de células Treg de bazo está asociada al surgimiento de la respuesta anti-parasitaria específica y la expansión de linfocitos CD8<sup>+</sup> totales en este órgano, se realizó el análisis de correlación de Spearman de

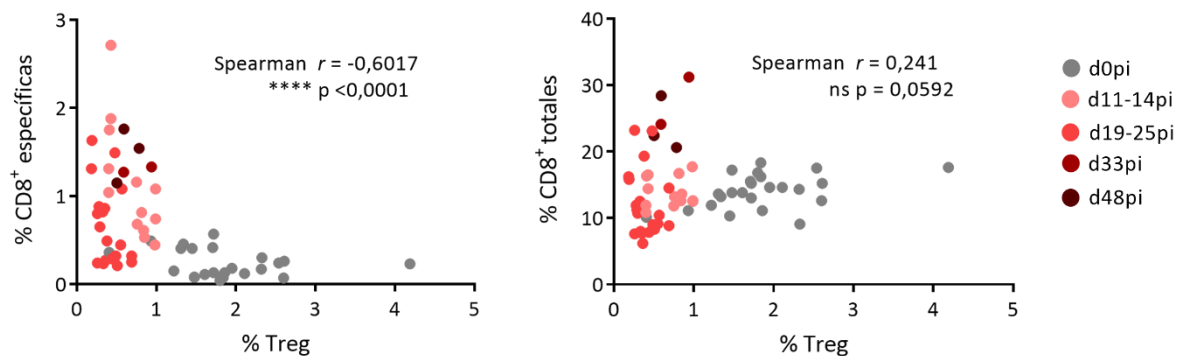


**Figura 14: Evolución de la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales y parásito-específicos en relación a la respuesta de células Treg durante la infección aguda con *T. cruzi*.**

**A)** Gráficos de puntos de citometría de la expresión de CD8 y la unión a tetrámeros TSKB20/K<sup>b</sup> en “gate” de células CD8<sup>+</sup> de bazo y sangre de ratones Foxp3-GFP infectados con *T. cruzi* a diferentes dpi. **B)** Gráficos que muestran la frecuencia (izquierda) y los números absolutos (derecha) de células Treg, CD8<sup>+</sup> totales (CD8<sup>+</sup>) y CD8<sup>+</sup> específicas para *T. cruzi* (CD8<sup>+</sup> TSKB20/K<sup>b</sup>) en el bazo de los ratones en (A). **C)** Relación en los números absolutos de células Treg a CD8<sup>+</sup> totales y a CD8<sup>+</sup> específicas en bazo de los ratones en (A). Los datos son presentados como promedio ± EEM, contando con un *n* de 2 a 24 animales correspondientes de 1 a 3 experimentos independientes según el dpi. Los valores *p* fueron calculados mediante ANOVA de una vía y posterior comparación múltiple de Dunnett, o el correspondiente análisis no paramétrico mediante test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn. \* *p* < 0,05; \*\* *p* < 0,01; \*\*\* *p* < 0,001; \*\*\*\* *p* < 0,0001.

la misma forma que anteriormente. En la figura 15 puede observarse que efectivamente existe una correlación moderada e inversa entre la frecuencia de células Treg y de T CD8<sup>+</sup> parásito-específicas en el bazo de animales Foxp3-GFP, con un alto grado de significancia. Sin embargo, no se encontró asociación entre la frecuencia de células Treg y de linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales.

En resumen, estos resultados indican que en la infección aguda con la cepa Tulahuén de *T. cruzi* en ratones Foxp3-GFP, la respuesta citotóxica se caracteriza por un gran número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para el péptido parasitario TSKB20, y que el incremento en la frecuencia de estos se asocia con la disminución en la frecuencia de células Treg en el bazo de estos ratones.



**Figura 15: La frecuencia de células Treg se correlaciona inversamente con la frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> parásito-específicos en bazo durante la infección aguda con *T. cruzi*.**

Gráficos de dispersión que representan la relación entre la frecuencia de células Treg y la de CD8<sup>+</sup> específicas para TSKB20 (izquierda) o CD8<sup>+</sup> totales (derecha) en el bazo de los ratones de la figura 14. Cada punto representa un animal. Se indica el coeficiente  $r$  de Spearman y la significación de la correlación. Los datos corresponden a 1, 2 ó 3 experimentos independientes según el dpi. ns = no significativo.

### Mecanismos responsables de la reducción de la frecuencia de células T regulatorias en la etapa aguda de la infección por *T. cruzi*

En el contexto de los resultados obtenidos hasta el momento y con el objetivo de comprender en detalle los procesos por los que transitan las células Treg durante la infección con *T. cruzi*, se prosiguió a estudiar las causas que conducen a la disminución en la frecuencia periférica de estas células. El proceso que controla la frecuencia de células T y B en periferia es llamado homeostasis de linfocitos, y actúa a través del balance entre generación, proliferación y muerte de estas células. Teniendo esto en cuenta, se prosiguió

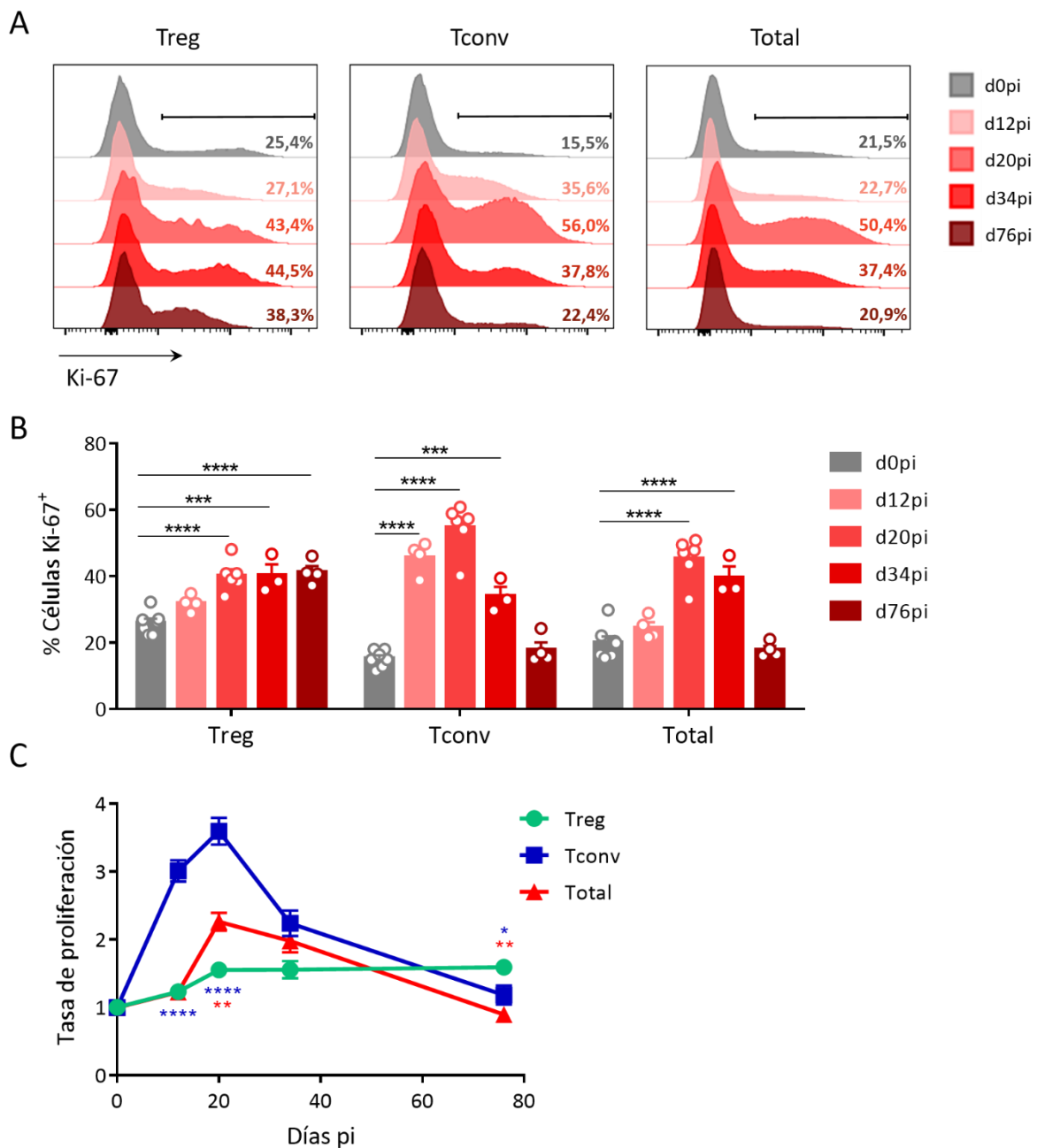
a estudiar los mecanismos que se detallan a continuación con el fin de determinar si participan en la reducción de la frecuencia de células Treg esplénicas: disminución en la tasa de proliferación de linfocitos Treg y/o incremento en su tasa de muerte celular respecto a las otras poblaciones celulares de bazo durante la infección, y deficiencia en la generación de células pTreg en animales infectados con *T. cruzi*. Los experimentos llevados a cabo para probar estas hipótesis se analizan a continuación. Por otra parte, teniendo en consideración los resultados de las secciones anteriores, se desestimó la existencia de fallas en la generación de células tTreg, dado que no se evidenciaron cambios en los números absolutos de células Treg en timo a lo largo de la infección (figura 3B).

### *Proliferación*

Con el fin de investigar la tasa de proliferación de células Treg durante la infección con *T. cruzi*, se evaluó la marcación intracelular para el factor de transcripción Ki-67 mediante citometría de flujo. Este factor se utiliza comúnmente como marcador de proliferación ya que se expresa durante las fases activas del ciclo celular (G1, G2, S y M), pero está ausente en células quiescentes (G0) [172]. De esta forma, se determinó el porcentaje de células Treg, Tconv y totales de bazo en proceso de proliferación en ratones Foxp3-GFP a diferentes tiempos de infección. Tal como muestra la figura 16, todas las poblaciones celulares analizadas proliferaron a lo largo de la infección, mostrando un incremento significativo en la frecuencia de células Ki-67<sup>+</sup> a partir del d12pi (Tconv) o del d20pi (Treg y Total) (figuras 16A y 16B).

A modo de profundizar en este análisis, a continuación se examinó la tasa de proliferación, calculada como la relación entre la frecuencia de células Ki-67<sup>+</sup> para cada ratón respecto del promedio al d0pi en cada población celular estudiada. Como se observa en la figura 16C, la tasa de proliferación se duplica y triplica para esplenocitos totales y células Tconv al d20pi, respectivamente, restableciéndose al valor de 1 al d76pi. En cambio, el perfil de la tasa de proliferación es muy diferente para las células Treg, donde el aumento es paulatino a medida que progresa la infección hasta el d20pi y luego se mantiene en una meseta, sin llegar a duplicarse en ninguno de los tiempos estudiados. Así, la tasa de proliferación de las células Treg es marcada y significativamente menor a la de las células Tconv entre los días 12 y 20pi, y a la de las células totales al d20pi. Por otro

lado, dado que en células Treg esta tasa no se restablece al valor inicial al d76pi, se ve incrementada respecto a la tasa de Tconv y esplenocitos totales en este momento.



**Figura 16: Las células Treg exhiben una expansión limitada en relación a otras poblaciones celulares durante la infección con *T. cruzi*.**

**A)** Histogramas de citometría de flujo representativos de la expresión de Ki-67 en la población de células Treg, Tconv o leucocitos totales de bazo de ratones Fopx3-GFP infectados con *T. cruzi* a diferentes dpi. Se indica el porcentaje de células Ki-67<sup>+</sup> para cada población en cada dpi. **B)** Gráficos de barras que muestran la frecuencia de células Ki-67<sup>+</sup> en las distintas poblaciones de bazo indicadas en (A). **C)** Tasa de proliferación en las distintas poblaciones celulares de bazo indicadas en (A). Los datos son presentados como promedio ± EEM, contando con un *n* de 3 a 7 animales correspondientes a un experimento para cada dpi. Los valores *p* fueron calculados mediante ANOVA de una vía y posterior test de comparaciones múltiples de Dunnett (B), o test de comparaciones múltiples de Sidak (C). \* *p* < 0,05; \*\* *p* < 0,01; \*\*\* *p* < 0,001; \*\*\*\* *p* < 0,0001. En (C) las estrellas azules indican el valor *p* para la comparación de Treg con Tconv, mientras que las rojas el valor *p* para la comparación Treg con Total en los diferentes dpi.



En síntesis, estos resultados indican que las células Treg de bazo incrementan su proliferación a lo largo de la infección con *T. cruzi*, pero su expansión es limitada en comparación con la experimentada por células Tconv y totales de este órgano, lo cual explicaría al menos en parte, la reducción en la frecuencia de células Treg esplénicas en animales infectados.

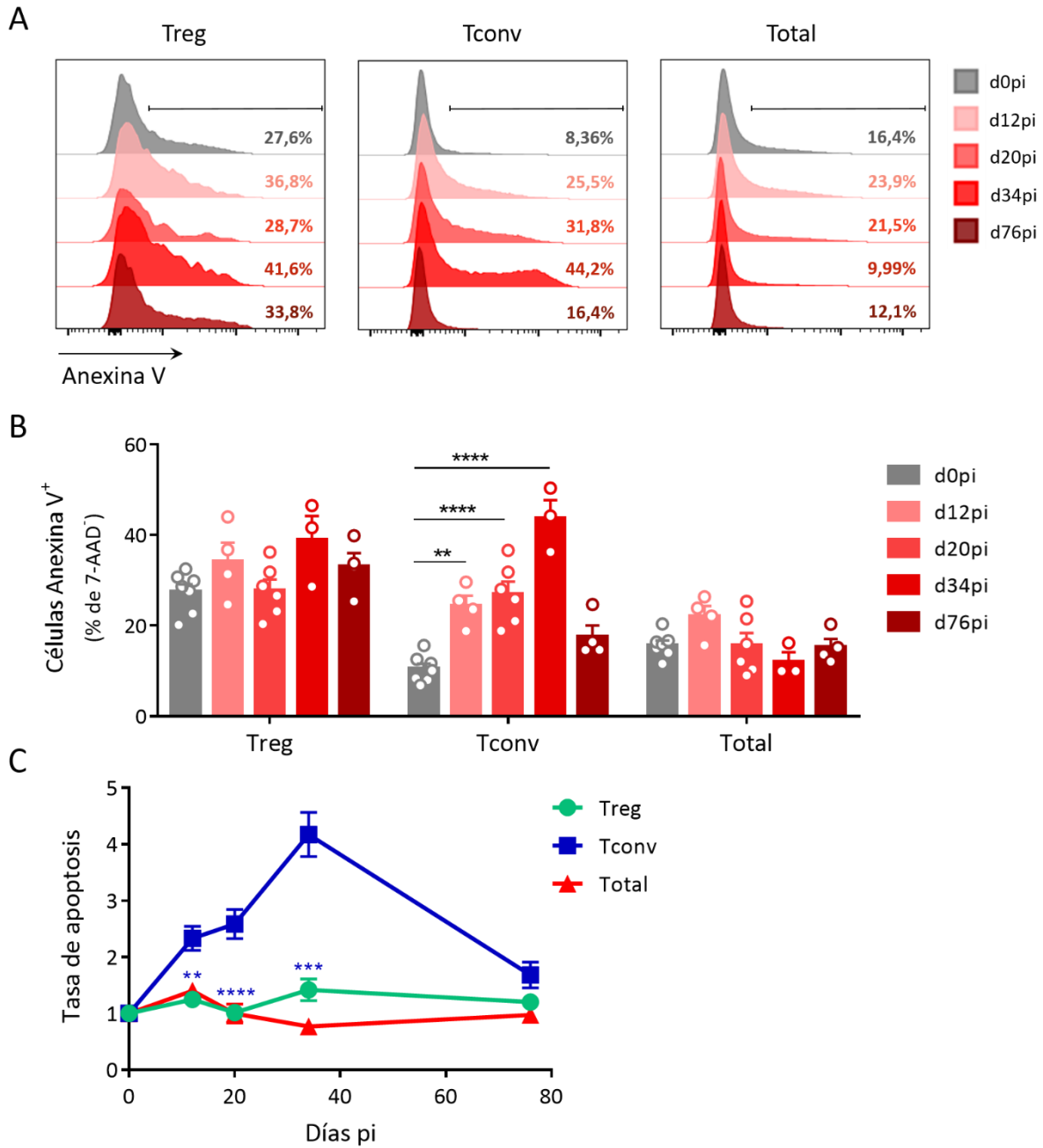
#### *Muerte celular*

Una vez considerada la proliferación, se prosiguió con el estudio de su contraparte, el análisis de muerte celular. Esto se llevó a cabo mediante la determinación de las células que experimentan apoptosis a través de citometría de flujo, gracias al uso de 7-AAD y Anexina V que permite distinguir las células vivas que están experimentando apoptosis temprana (7-AAD<sup>-</sup> Anexina V<sup>+</sup>). De esta forma, se procedió a determinar el porcentaje de células apoptóticas dentro de las poblaciones de células Treg, Tconv y leucocitos totales de bazo en ratones Foxp3-GFP a diferentes tiempos de infección.

Así, se pudo establecer que el porcentaje de células Treg que sufre apoptosis está elevado con respecto de las otras poblaciones estudiadas en animales no infectados (d0pi) (figuras 17A y B). Sin embargo, la frecuencia de células Treg en apoptosis temprana se mantiene en valores similares a la de los controles no infectados a lo largo de todos los tiempos de infección estudiados, mientras que el porcentaje de células Tconv bajo apoptosis se incrementa significativamente entre los días 12 y 34pi respecto a los animales no infectados. Por otra parte, la frecuencia de esplenocitos totales que mueren por apoptosis tampoco varía significativamente a lo largo de la infección en comparación con animales no infectados.

De esta forma, al examinar la tasa de apoptosis, calculada como la relación entre la frecuencia de células Anexina V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>-</sup> para cada ratón respecto del promedio al d0pi en cada población celular estudiada, se observa que mientras esta tasa se incrementa más de 4 veces hasta el d34pi para células Tconv, en el caso de células Treg y esplenocitos totales se mantiene en valores cercanos a 1 (figura 17C).

En resumen, estos resultados indican que la infección con *T. cruzi* no incrementa la tasa de apoptosis de las células Treg, por lo que la reducción en la frecuencia de células Treg esplénicas no es consecuencia de una muerte celular desproporcionada de esta población respecto a la de células Tconv y células totales de bazo.



**Figura 17: Las células Treg no sufren apoptosis excesiva en relación a otras poblaciones celulares durante la infección aguda con *T. cruzi*.**

**A)** Histogramas de citometría de flujo representativos para la marcación con Anexina V en “gate” 7-AAD<sup>-</sup> para células Treg, Tconv o leucocitos totales de bazo de ratones Foxp3-GFP infectados con *T. cruzi* a diferentes dpi. Se indica el porcentaje de células Anexina V<sup>+</sup> para cada población en cada dpi. **B)** Gráficos de barras que muestran la frecuencia de células Anexina V<sup>+</sup> en las distintas poblaciones de bazo indicadas en (A). **C)** Tasa de apoptosis en las distintas poblaciones celulares de bazo de los ratones en (A). Los datos son presentados como promedio ± EEM, contando con un *n* de 3 a 7 animales correspondientes a un experimento para cada dpi. Los valores *p* fueron calculados mediante ANOVA de una vía y posterior test de comparaciones múltiples de Dunnett (B), o test de comparaciones múltiples de Sidak (C). \* *p* < 0,05; \*\* *p* < 0,01; \*\*\* *p* < 0,001; \*\*\*\* *p* < 0,0001. En (C) las estrellas azules indican el valor *p* para la comparación de Treg con Tconv en los diferentes dpi.

### *Inducción de células pTreg*

Como se mencionó previamente, el conjunto de células Treg que se encuentran en periferia proviene de dos orígenes, uno tímico que genera células tTreg a partir de timocitos CD4 simple positivos y donde la especificidad se cree que es principalmente dirigida hacia auto-antígenos, y otro periférico dado por la inducción de células pTreg. Las células pTreg se diferencian a partir de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes luego del estímulo principalmente por antígenos dietarios, alérgenos y microorganismos comensales o infecciosos, en medioambientes permisivos para la inducción de Foxp3 y por lo tanto, exhibirían especificidades antigénicas diferentes respecto a las células tTreg [76, 173]. Dada la dificultad existente para distinguir entre células tTreg y pTreg a través de marcadores fenotípicos, aún no se conoce de forma fehaciente las contribuciones de cada población particular a la población general de células Treg presentes en órganos linfoides periféricos, tanto en homeostasis como en estados patogénicos [173].

En este contexto, y teniendo en cuenta que los números absolutos de células Treg en timo no se modificaron a lo largo de la infección con *T. cruzi*, mientras que se observó una disminución importante de estos números al d20pi en GLM, sitio anatómico privilegiado para la generación de pTreg (figura 8), es que surgió la hipótesis de una inducción deficiente de células pTreg durante la infección con *T. cruzi* como mecanismo que podría explicar la disminución en la frecuencia de células Treg observada en periferia. Con el objetivo entonces de investigar la generación de pTreg en nuestro modelo de infección, se propusieron experimentos con diferentes metodologías.

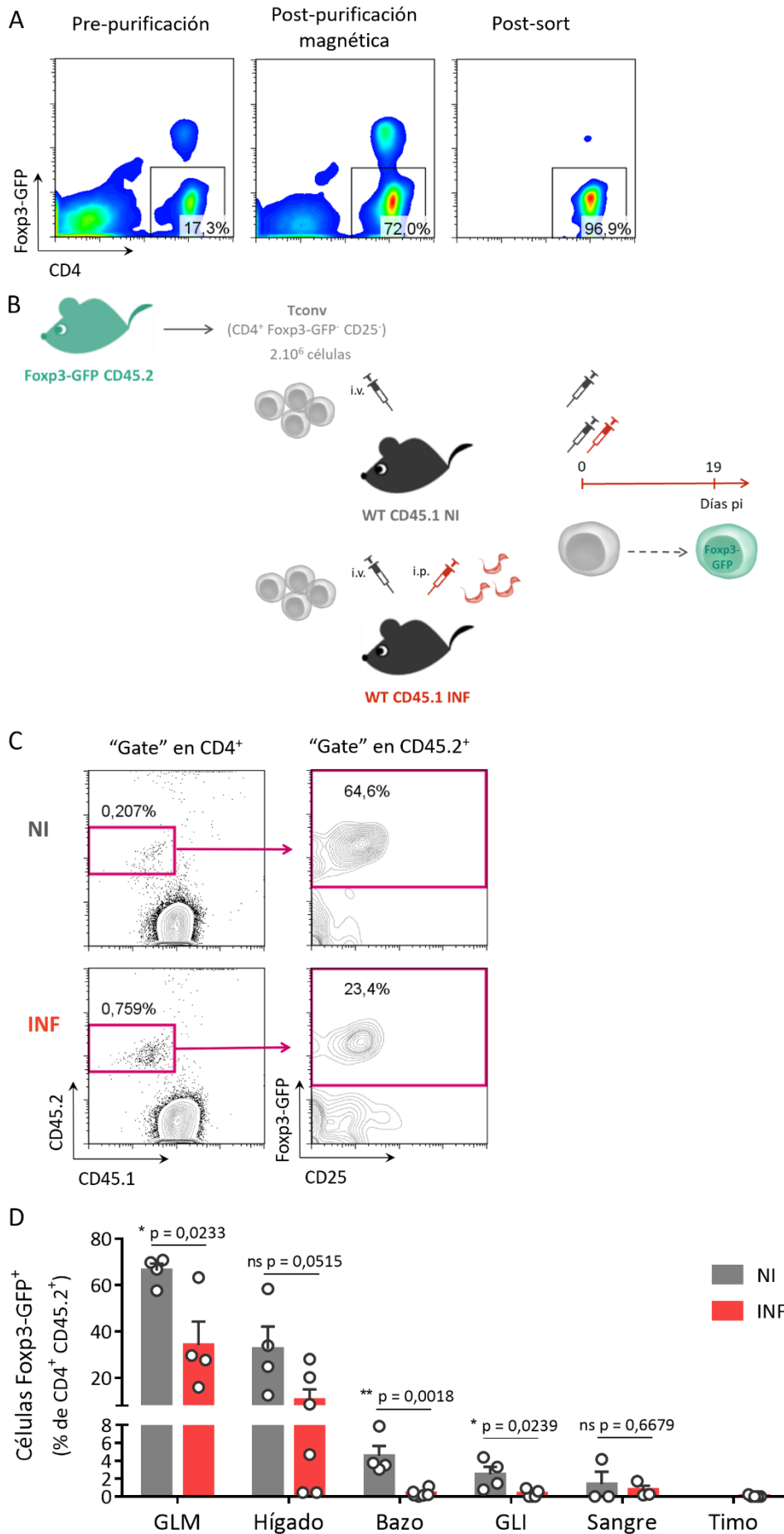
En primer lugar, se estudió la inducción de células pTreg en la infección con *T. cruzi* a través de experimentos de transferencia adoptiva de células. Esto fue posible gracias al uso de ratones congénicos para el antígeno leucocitario común CD45, animales CD45.2 y CD45.1 respectivamente. La transferencia de células entre estos animales permite distinguir las células de origen hematopoyético propias del hospedador de las células transferidas, mediante la utilización de anticuerpos específicos para cada uno de los marcadores. En este sentido, se purificaron células Tconv (CD4<sup>+</sup> Foxp3-GFP<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>) a partir de bazo de ratones Foxp3-GFP CD45.2 no infectados, mediante un enriquecimiento inicial en linfocitos T CD4<sup>+</sup> a través de perlas magnéticas seguido de "cell sorting". La pureza de las células al finalizar este procesamiento fue mayor al 95% (figura 18A). A continuación, 2 millones de células Tconv purificadas se inyectaron en forma intravenosa

en ratones WT CD45.1, los cuales fueron simultáneamente infectados con la dosis habitual de tripomastigotes. Además, ratones CD45.1 transferidos pero no infectados se utilizaron como controles (figura 18B). Es relevante destacar que un alto porcentaje de las células Tconv provenientes de animales no infectados que se transfirieron corresponden a células T CD4<sup>+</sup> vírgenes (50-75% en ratones Foxp3-GFP).

Los ratones transferidos e infectados y los controles transferidos no infectados, fueron sacrificados al d19pi (momento de la mayor reducción de la frecuencia de células Treg en órganos periféricos) y se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de células transferidas (identificadas como CD4<sup>+</sup> CD45.2<sup>+</sup>) que expresaron Foxp3-GFP en diferentes órganos. En otras palabras, se evaluó el porcentaje de las células CD4<sup>+</sup> transferidas que se diferenciaron a células Treg en condiciones homeostáticas (animales transferidos no infectados) o en el contexto de la infección (animales transferidos infectados) (figura 18B). Como se observa en la figura 18C (izquierda), un pequeño porcentaje de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales presentes en GLM de los animales CD45.1 receptores correspondieron a las células transferidas, identificadas como CD45.2<sup>+</sup>CD45.1<sup>-</sup>, tanto de aquellos que fueron infectados como de los controles. Al analizar estas células, se pudo determinar que un gran porcentaje de las mismas se diferenció a célula Treg en animales no infectados, visto que indujeron la expresión de Foxp3-GFP (figura 18C, derecha). Notablemente, este porcentaje fue significativamente menor en animales infectados al d19pi. Resultados similares se obtuvieron en la mayoría de los órganos periféricos estudiados, incluyendo hígado, bazo y GLL, si bien la magnitud de la

**Figura 18: La generación de células pTreg se encuentra comprometida durante la infección aguda con *T. cruzi*.**

**A)** Gráficos de citometría de flujo representativos de la expresión de Foxp3-GFP y CD4 en el bazo de ratones Foxp3-GFP antes de la purificación (izquierda), luego del enriquecimiento en linfocitos CD4<sup>+</sup> mediante métodos magnéticos (centro) y al finalizar el proceso de “cell sorting” (derecha). **B)** Esquema experimental. Células Tconv (CD4<sup>+</sup> Foxp3-GFP<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>) se purificaron de bazo de ratones Foxp3-GFP CD45.2 y se transfirieron a ratones CD45.1 receptores, que fueron o no infectados simultáneamente con *T. cruzi*. Diecinueve días luego de la transferencia, se evaluó en diferentes órganos la conversión de las células transferidas (Foxp3-GFP<sup>-</sup>) a Treg (Foxp3-GFP<sup>+</sup>). **C)** Gráficos de citometría de flujo representativos de la expresión de CD45.1 y CD45.2 en la población CD4<sup>+</sup> (izquierda) y de la expresión de CD25 y Foxp3-GFP en la población CD45.2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (derecha) determinado en leucocitos de GLM de ratones receptores WT CD45.1 no infectados (NI) o al d19pi (INF). **D)** Gráficos de barras que muestran la frecuencia de células que indujeron Foxp3-GFP dentro de la población de células Tconv transferidas (CD45.2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> en todos los órganos, y CD45.2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> en timo) en diferentes órganos de ratones CD45.1 no infectados (NI) o al d19pi (INF). Los datos son presentados como promedio + EEM y corresponden a un *n* de 4 a 6 animales provenientes de dos experimentos independientes. Los valores *p* fueron calculados mediante t-test no apareado. ns = no significativo.



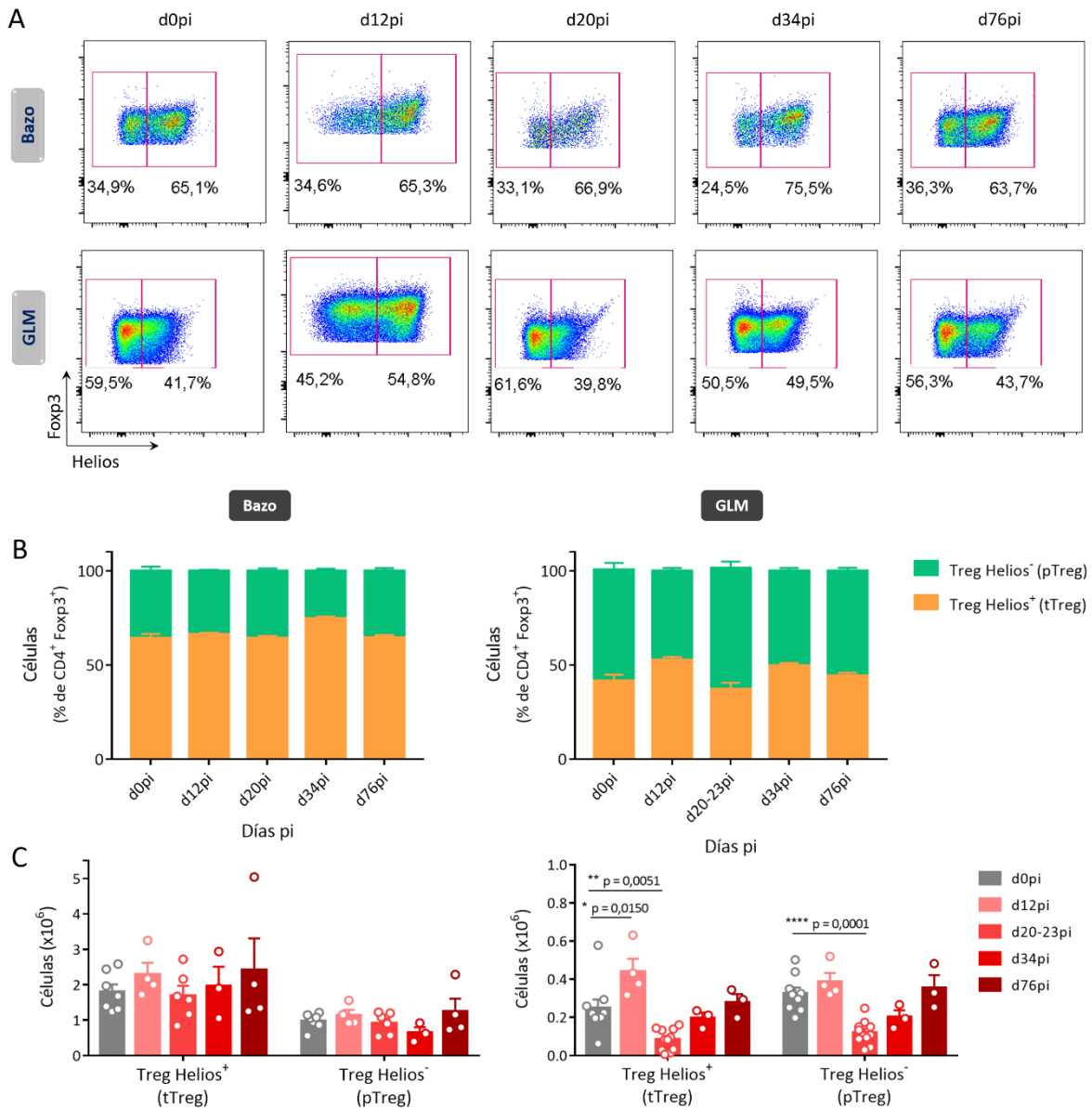
diferenciación a células Treg a partir de las células transferidas fue menor a la observada en GLM. Resulta interesante destacar que no se detectaron células transferidas en timo de animales no infectados pero sí al d19pi, aunque estas células presentes en timo de ratones infectados no indujeron la expresión de Foxp3-GFP.

En concordancia con la bibliografía y considerando los diferentes órganos estudiados, el mayor porcentaje de diferenciación a células Treg se observó en GLM, conforme al concepto de que el tejido linfoide intestinal es el sitio privilegiado para la generación de células pTreg debido a su microambiente rico en TGF- $\beta$  y otros factores asociados a inmunosupresión [174, 175]. En cambio, el porcentaje de células Treg que se indujeron en bazo y GLI fue marcadamente menor. De forma sorprendente se observó un alto porcentaje de células transferidas convertidas a células Treg en hígado, tanto de animales control como de aquellos infectados. Sin embargo, si bien la presencia de estas células en los diferentes órganos puede indicar una diferenciación a células Treg *in situ*, otras hipótesis son compatibles, como una diferenciación en órganos linfoides secundarios y posterior migración hacia el órgano en el que fueron detectadas.

En síntesis, estos resultados indican que durante la infección con *T. cruzi* se restringe la generación de células pTreg, y esto explicaría, al menos en parte, la reducción de la frecuencia de células Treg en bazo y los menores números absolutos de células Treg en GLM al momento del pico de la infección.

Como segunda aproximación experimental para estudiar la inducción de células pTreg en la infección, y a modo de confirmar los resultados anteriores, se evaluó mediante citometría de flujo la expresión de Helios en células Treg. Si bien con ciertas limitaciones mencionadas previamente, esta molécula ha sido propuesta como marcador para distinguir entre células tTreg y pTreg, expresándose en las primeras pero no en las segundas [79]. Así, se evaluó la proporción de células con fenotipo indicativo de origen tímico y periférico dentro del conjunto de células Treg presente en bazo y GLM de ratones Foxp3-GFP a diferentes tiempos de infección. En concordancia con la bibliografía, entre un 60 y 70 % de las células Treg esplénicas de animales no infectados expresaron Helios (figuras 19A y 19B). Este porcentaje fue menor para el caso de GLM, donde la proporción de células Treg Helios<sup>+</sup> fue cercana al 40%. Una vez establecida la infección con *T. cruzi*, las proporciones de células Treg Helios<sup>+</sup> (tTreg) y Helios<sup>-</sup> (pTreg) no mostraron variaciones significativas respecto de los controles no infectados, pero se observó una tendencia de

incremento en el porcentaje de células Treg Helios<sup>+</sup> (tTreg) en detrimento de las células Treg Helios<sup>-</sup> (pTreg) al d12pi en GLM y al d34pi en ambos órganos estudiados. Resulta interesante destacar que la proporción de células Treg Helios<sup>-</sup> (pTreg) se encuentra más representada en GLM en comparación con el bazo en todos los tiempos de infección



**Figura 19: Los números absolutos de células Treg Helios<sup>+</sup> y Helios<sup>-</sup> se reducen en GLM durante el pico de la infección aguda con *T. cruzi*.**

**A)** Gráficos de citometría de flujo representativos de la expresión intracelular de los factores de transcripción Foxp3 y Helios dentro de la población de células Treg de bazo y GLM en ratones Foxp3-GFP a diferentes dpi. **B)** Gráficos que muestran la frecuencia de células Treg Helios<sup>+</sup> y Helios<sup>-</sup> en bazo (izquierda) y GLM (derecha) de los ratones en (A). **C)** Gráficos de barras para los números absolutos de células Treg Helios<sup>+</sup> y Helios<sup>-</sup> en bazo (izquierda) y GLM (derecha) de los ratones en (A). Los datos son presentados como promedio + EEM, contando con un *n* de 3 a 11 animales correspondientes de 1 a 2 experimentos independientes según el dpi. Los valores *p* fueron calculados mediante ANOVA de una vía y posterior comparación múltiple de Dunnett, o el correspondiente análisis no paramétrico mediante test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn.

estudiados, en concordancia con el concepto de que el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal es un sitio biológicamente importante para la inducción de células pTreg.

Previamente se observó un incremento inicial en los números absolutos de células Treg al d12pi en GLM, seguido de una reducción al d20pi (figura 8), y se determinó la existencia de limitaciones en la generación de células pTreg durante el pico de la infección con *T. cruzi* (figura 18). Con el fin de discernir si las variaciones en los números absolutos de células Treg totales de GLM son consecuencia de cambios en los números de células pTreg en animales infectados, a continuación se calcularon los números absolutos de células Treg Helios<sup>+</sup> (tTreg) y Treg Helios<sup>-</sup> (pTreg) a diferentes tiempos de infección. Como se observa en la figura 19C, los números absolutos de ambas poblaciones de células Treg no se modifican a lo largo de la infección respecto de los controles no infectados en bazo pero sí lo hacen en GLM, donde se observa un incremento inicial en los números de células Treg Helios<sup>+</sup> (tTreg) al d12pi seguido de una disminución entre los días 20 y 23 pi, mientras que los números de células Treg Helios<sup>-</sup> (pTreg) se reducen marcadamente en los días 20 a 23 pi. Estos resultados indican que el incremento inicial en el número absoluto de células Treg totales observado al d12pi está dado por el aumento en los números de la población Helios<sup>+</sup> (tTreg) presentes en GLM en este momento, mientras que la reducción al d20pi es producto de la caída en los números de ambas poblaciones, Treg Helios<sup>+</sup> (tTreg) y Treg Helios<sup>-</sup> (pTreg), en este órgano al momento del pico de la infección. Teniendo en cuenta que solo las células pTreg pueden inducirse en GLM, estos datos refuerzan los resultados previos que señalan fallas en la generación de células pTreg durante la infección con *T. cruzi*.

### *Papel de las señales de citoquinas pro-inflamatorias sobre los números de células Treg*

Con el objetivo de profundizar sobre las causas que conducen a la limitación en la inducción de células pTreg durante la infección con *T. cruzi* se prosiguió a estudiar las señales responsables de este efecto. Actualmente se conoce que ciertas infecciones en las que también se observa una disminución en los números de células Treg, como las producidas por *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes* y virus vaccinia, cursan con una reducción en los niveles de IL-2 [147, 148]. Dado que esta citoquina es un factor de supervivencia y proliferación esencial para las células Treg, se ha propuesto un modelo en el



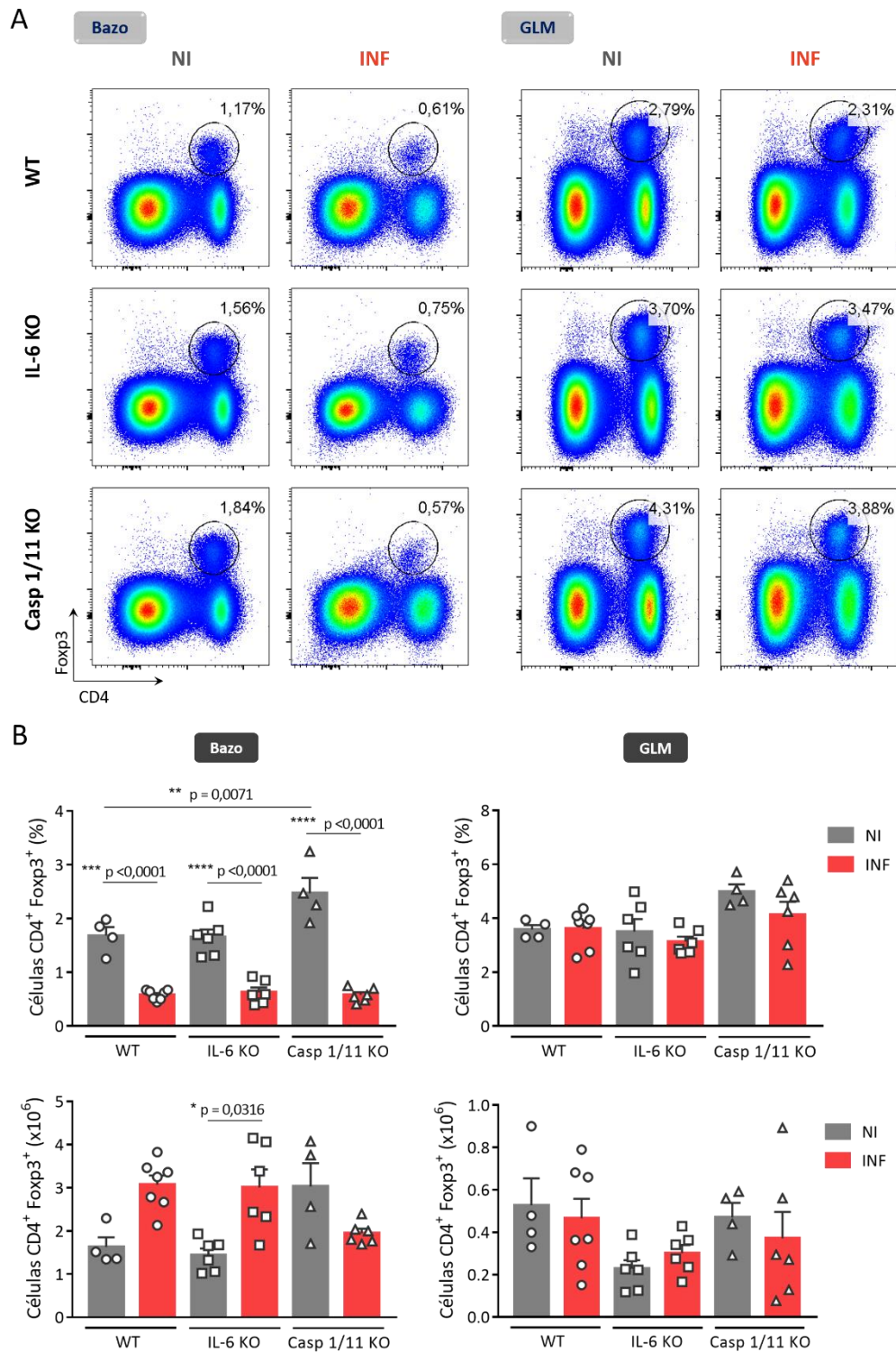
que la producción excesiva de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- $\gamma$  e IL-27 inducen la carencia de IL-2 en estas infecciones, conduciendo a una tasa incrementada de apoptosis por parte de las células Treg al mismo tiempo que se desfavorece la proliferación de las mismas [97]. Sin embargo, durante nuestro modelo de infección con *T. cruzi* los niveles de IL-2 no se reducen en comparación con los de animales no infectados (figura 12), y las células Treg son capaces de proliferar (figura 16) a la vez que su nivel de apoptosis no se ve incrementado con la infección (figura 17).

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de células pTreg a partir de células vírgenes es un evento fundamental para mantener el número de células Treg en un hospedador. Se ha reportado que diversas citoquinas, particularmente aquellas pro-inflamatorias como la IL-6 inhiben la expresión de Foxp3 en células T CD4<sup>+</sup> vírgenes y por lo tanto la diferenciación hacia Treg [176, 177], mientras que IL-1 $\beta$  es necesaria para reforzar este efecto [178]. En este sentido, la presencia de estas citoquinas afecta el número de células pTreg y la respuesta regulatoria. Nuestros resultados (figura 12) y diversos reportes indican un incremento en los niveles séricos y tisulares de IL-6 e IL-1 $\beta$  durante la infección experimental con *T. cruzi* así como en pacientes chagásicos, especialmente en aquellos que exhiben patología cardíaca [179-184]. Con la finalidad entonces de determinar si el incremento en la producción de IL-6 e IL-1 $\beta$  durante la infección con *T. cruzi* está involucrado en la reducción de la frecuencia de células Treg, se realizaron experimentos con ratones WT, deficientes en IL-6 (IL-6 KO) y deficientes en Caspasa-1/11 (Caspasa-1/11 KO). Es importante señalar que en estos últimos, la deficiencia en las enzimas Caspasas limita no solo la maduración de IL-1 $\beta$  a su forma activa, sino también la de IL-18, al igual que afecta la secreción de IL-1 $\alpha$  e IFN- $\gamma$  luego de diferentes estímulos inflamatorios [185-188]. Asimismo, se ha determinado previamente en nuestro laboratorio que durante la infección con la cepa Tulahuén de *T. cruzi*, los animales Caspasa-1/11 KO presentan niveles plasmáticos reducidos de IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-10 respecto de ratones WT [184].

Animales deficientes en IL-6 o Caspasa-1/11 y controles WT fueron infectados con *T. cruzi* y se evaluaron la frecuencia y los números absolutos de células Treg en bazo y GLM al d18pi. También se determinaron estos parámetros en ratones no infectados de cada una de las cepas, a modo de determinar los números de células Treg en condiciones

homeostáticas. La medición de los números de células Treg en estos animales fue posible a través de citometría de flujo intracelular utilizando anticuerpos anti-Foxp3. De manera similar a lo observado anteriormente en ratones Foxp3-GFP, los ratones infectados con *T. cruzi*, tanto WT como deficientes en IL-6 y Caspasa-1/11, exhiben una marcada reducción en la frecuencia de células Treg esplénicas en comparación con los respectivos controles no infectados (figura 20). Al analizar las diferencias entre cepas, los ratones Caspasa-1/11 KO no infectados muestran una frecuencia incrementada de células Treg esplénicas en comparación con su contraparte WT, sin embargo no se observaron diferencias en el porcentaje de estas células entre las cepas deficientes y los animales WT luego de la infección. De la misma forma, la frecuencia y los números absolutos de esta población en GLM fueron similares entre todos los grupos infectados (figura 20).

En síntesis, estos resultados indican que IL-6 y las citoquinas cuya síntesis se ve afectada por la actividad de las Caspasas 1 y 11 (IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF e IFN- $\gamma$ ) no juegan un papel en la reducción de la frecuencia de células Treg durante por la infección con *T. cruzi*, sugiriendo que tampoco participan en la limitación de la inducción de células pTreg en esta infección.



**Figura 20: La deficiencia en IL-6 o Caspasa-1/11 no afecta los números de células Treg en bazo y GLM durante la infección con *T. cruzi*.**

**A)** Gráficos de citometría de flujo representativos para la tinción de CD4 y Fopx3 en bazo y GLM de ratones WT, IL-6 KO y Caspasa-1/11 KO al d18pi (INF) o de controles no infectados (NI). **B)** Gráficos que muestran la frecuencia (arriba) y los números absolutos (abajo) de células Treg en bazo (izquierda) y GLM (derecha) de los ratones en (A). Los datos son presentados como promedio + EEM, contando con un  $n$  de 4 a 7 animales correspondientes a 2 experimentos independientes. Los valores  $p$  fueron calculados mediante ANOVA de una vía y posterior comparación múltiple de Tukey, o el correspondiente análisis no paramétrico mediante test de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples de Dunn.

## Caracterización fenotípica, transcripcional y funcional de las células T regulatorias durante la infección con *T. cruzi*

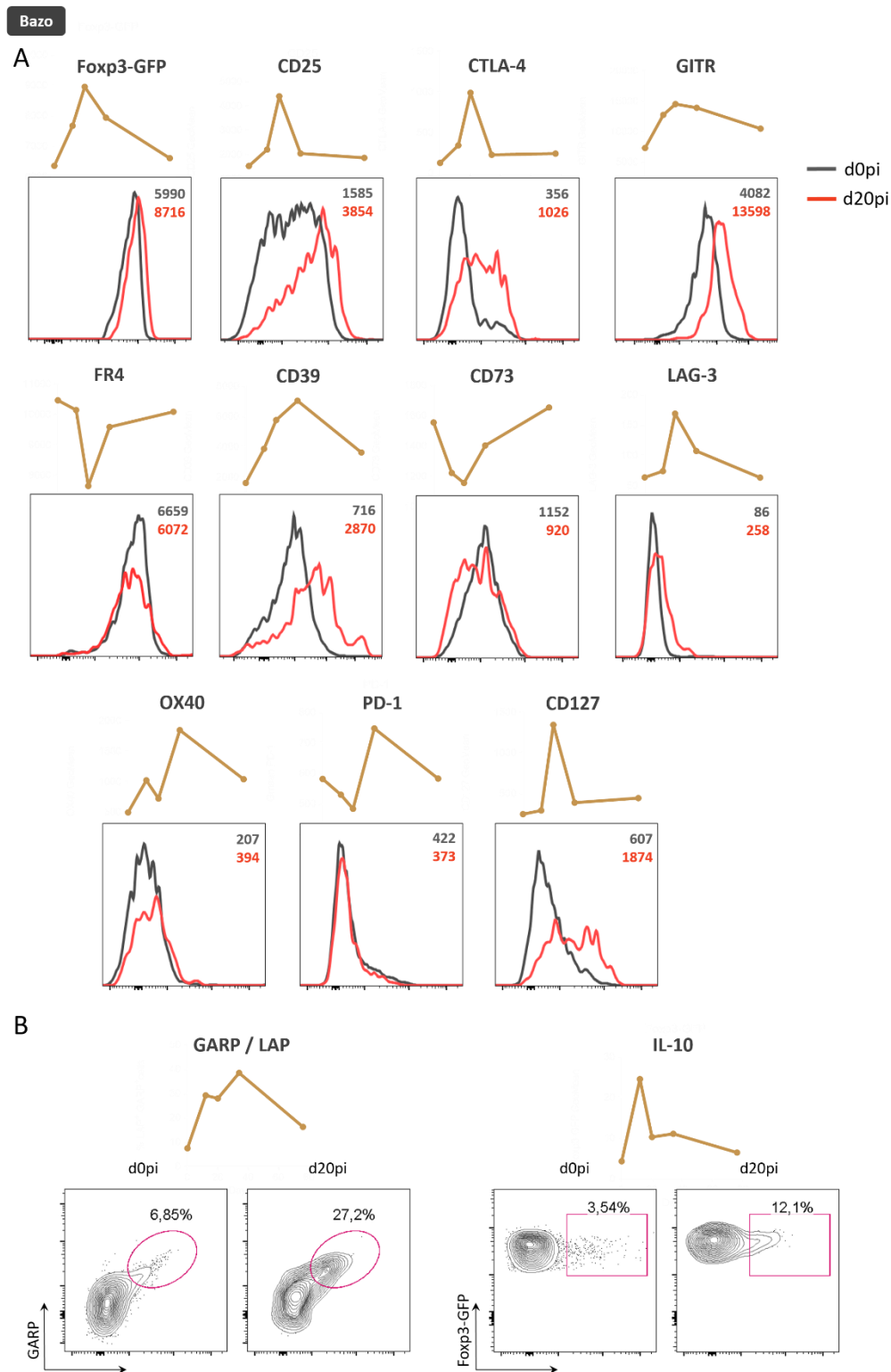
Teniendo cuenta la heterogeneidad fenotípica y funcional que experimentan las células Treg en diferentes contextos inflamatorios, resultó relevante investigar el estado de activación, migración y funcionalidad de estas células durante la infección con *T. cruzi*. Los resultados expuestos hasta el momento indican que la magnitud de la respuesta de células Treg es deficiente en relación a la respuesta efectora que se monta en la fase aguda de la infección. En este contexto, es posible que el gran estado inflamatorio inducido por el parásito gatille la expresión de diferentes moléculas en las células Treg presentes, incrementando tanto su funcionalidad supresora como su capacidad migratoria hacia focos inflamatorios. Así, la posible activación de las células Treg y su diferenciación a un fenotipo efector podrían compensar la reducción en su frecuencia, sin comprometer por lo tanto a la capacidad regulatoria global durante la infección con *T. cruzi*. Para poner esto a prueba, se evaluó la expresión de diferentes marcadores de superficie e intracelulares relacionados a la función supresora, migración, especialización y polarización de la respuesta (tabla 1, Introducción), en las células Treg de animales Foxp3-GFP a diferentes tiempos de infección. Este análisis se llevó a cabo tanto a nivel proteico mediante citometría de flujo, como a nivel transcripcional a través de la secuenciación del ARN (RNAseq). Asimismo, se examinó la capacidad supresora *in vitro* de las células Treg durante la infección mediante ensayos característicos que se describen a continuación.

### *Análisis fenotípico y funcional por citometría de flujo*

El estudio del estado de activación y especialización funcional de las células Treg mediante citometría de flujo se llevó a cabo mayormente en el bazo de ratones Foxp3-GFP a lo largo de la respuesta aguda frente al *T. cruzi*. Algunos de los marcadores también se estudiaron en otros órganos relevantes como ganglios, sangre e hígado.

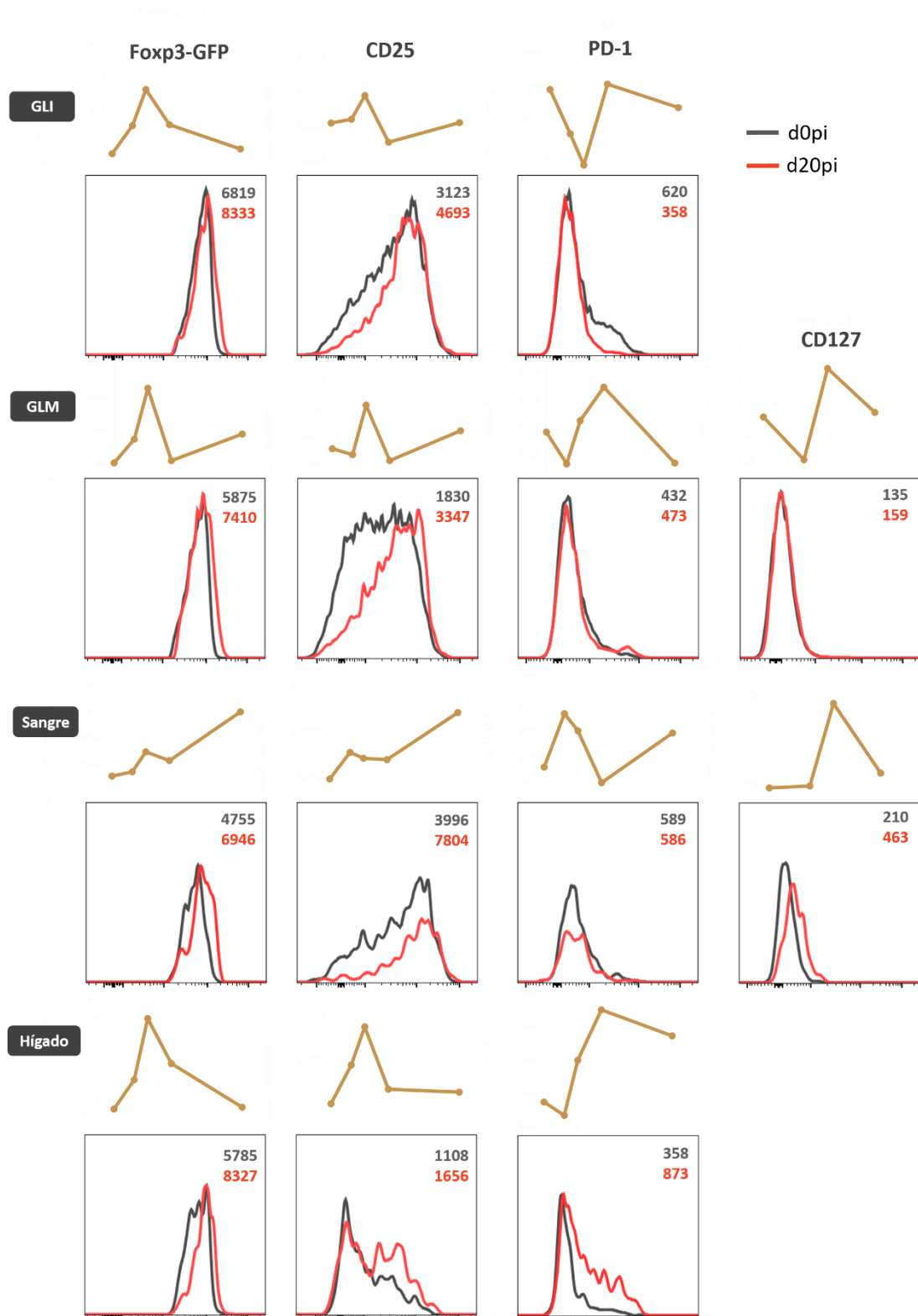
En primer lugar se analizaron marcadores de función supresora. En concordancia con la bibliografía, las células Treg de bazo de ratones no infectados mostraron alta expresión de moléculas características, como Foxp3, CD25, GITR y FR4, y una pequeña

proporción de estas células fue capaz de producir las citoquinas TGF- $\beta$  e IL-10 (figura 21). Luego de la infección con *T. cruzi*, se incrementó notablemente la expresión de la mayoría de los marcadores evaluados, en general mostrando un nivel máximo de expresión en las células Treg al d20pi (Foxp3, CD25, CTLA-4, GITR, LAG-3 y CD127), mientras que unas pocas moléculas, como CD39, OX40 y PD-1, tuvieron picos al d34pi. Además, en comparación con las células provenientes de animales no infectados, al d20pi una proporción superior fue capaz de producir las citoquinas anti-inflamatorias características, encontrándose la mayor frecuencia de células Treg productoras de TGF- $\beta$  que co-expresan GARP al d34pi, mientras que el porcentaje de las productoras de IL-10 exhibió un pico al d12pi. Por el contrario, del conjunto de moléculas estudiadas sólo dos de ellas, FR4 y CD73, experimentaron una reducción en su nivel de expresión sobre las células Treg, que se observa al d20pi y a lo largo de la fase aguda, respectivamente. Las células Treg del resto de órganos estudiados también mostraron variaciones en el nivel de expresión de algunos marcadores de función supresora a lo largo de la infección, correspondiéndose en general con los cambios observados en la expresión de cada marcador en bazo (figura 22).



**Figura 21: Las células Treg esplénicas exhiben un perfil activado durante la infección con *T. cruzi*.**

**A-B)** Gráficos de citometría de flujo representativos de la expresión de marcadores de activación y función supresora (A) y de la producción de citoquinas (B) en la población de células Treg de bazo de ratones Foxp3-GFP no infectados (d0pi) o al d20pi. Los números dentro de los gráficos indican la media geométrica del nivel de expresión (A) o el porcentaje de células positivas (B). Las líneas doradas sobre los gráficos muestran la variación en la media geométrica (A) o en el porcentaje (B) a lo largo de la infección en los días 0, 12, 20, 34 y 76 pi. Los datos son presentados como el promedio de un *n* de 3 a 11 animales correspondientes a 1 ó 2 experimentos independientes según el dpi.

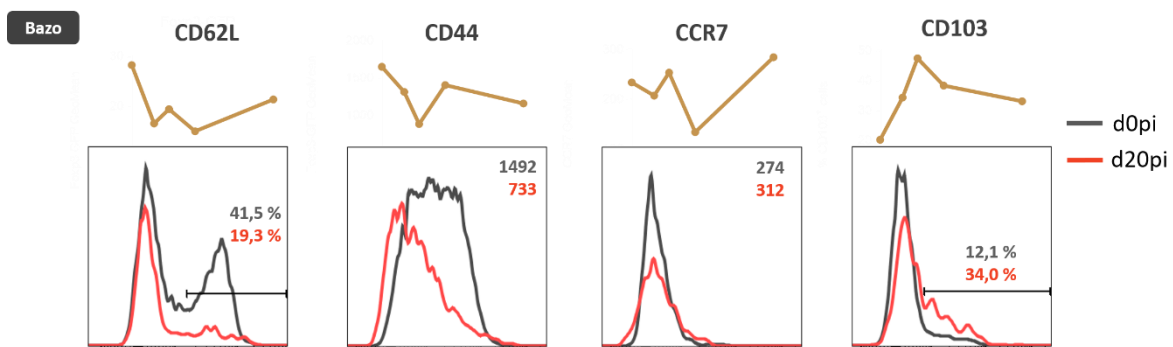


**Figura 22: Las células Treg de órganos periféricos exhiben un perfil activado durante la infección con *T. cruzi*.**

Gráficos de citometría de flujo representativos para la expresión de Foxp3 y marcadores de superficie en selección de células Treg de ganglios, sangre e hígado de ratones Foxp3-GFP no infectados (d0pi) o al d20pi. Los números dentro de los histogramas indican la media geométrica del nivel de expresión y las líneas doradas sobre los gráficos muestran la variación de la media geométrica para cada marcador a lo largo de la infección en los días 0, 12, 20, 34 y 76 pi. Los datos son presentados como el promedio de un  $n$  de 2 a 11 animales correspondientes a 1 ó 2 experimentos independientes según el dpi y el marcador analizado.

En segunda instancia, se determinó a distintos tiempos de infección el nivel de expresión de receptores de quemoquinas, moléculas de adhesión y marcadores de activación que permiten diferenciar los subtipos de células Treg centrales y efectoras. Como se observa en la figura 23, en el transcurso de la fase aguda de la infección con *T. cruzi* disminuyó el nivel de expresión de CCR7 en células Treg esplénicas, así como el porcentaje de células que expresan CD62L y, al mismo tiempo, se incrementó la frecuencia de células que expresan CD103 en comparación con las provenientes de animales no infectados. Estos cambios son consistentes con la adquisición de un fenotipo efector por parte de las células Treg. Sin embargo, también se observó que al d20pi estas células disminuyeron su nivel de expresión de CD44 en relación a las de no infectados, lo cual a diferencia de los resultados previos, da cuenta de un fenotipo central en vez de efector. Resultados equivalentes en cuanto a la expresión de CD62L y CD44 se observaron en las células Treg de ganglios, sangre e infiltrado hepático (datos no mostrados).

Por último, teniendo en cuenta que la respuesta inmune frente a *T. cruzi* se caracteriza por una marcada inflamación de tipo 1, se evaluó si las células Treg se polarizan hacia un perfil Th1-like durante la infección. Para ello, se determinó el nivel de expresión de T-bet y CXCR3, así como la capacidad de producir IFN- $\gamma$  por parte de las células Treg a distintos tiempos de la fase aguda. Como se observa en la figura 24A, las células Treg incrementan la expresión de estos marcadores, al mismo tiempo que un mayor porcentaje de estas células produce IFN- $\gamma$ . Es interesante destacar que la expresión



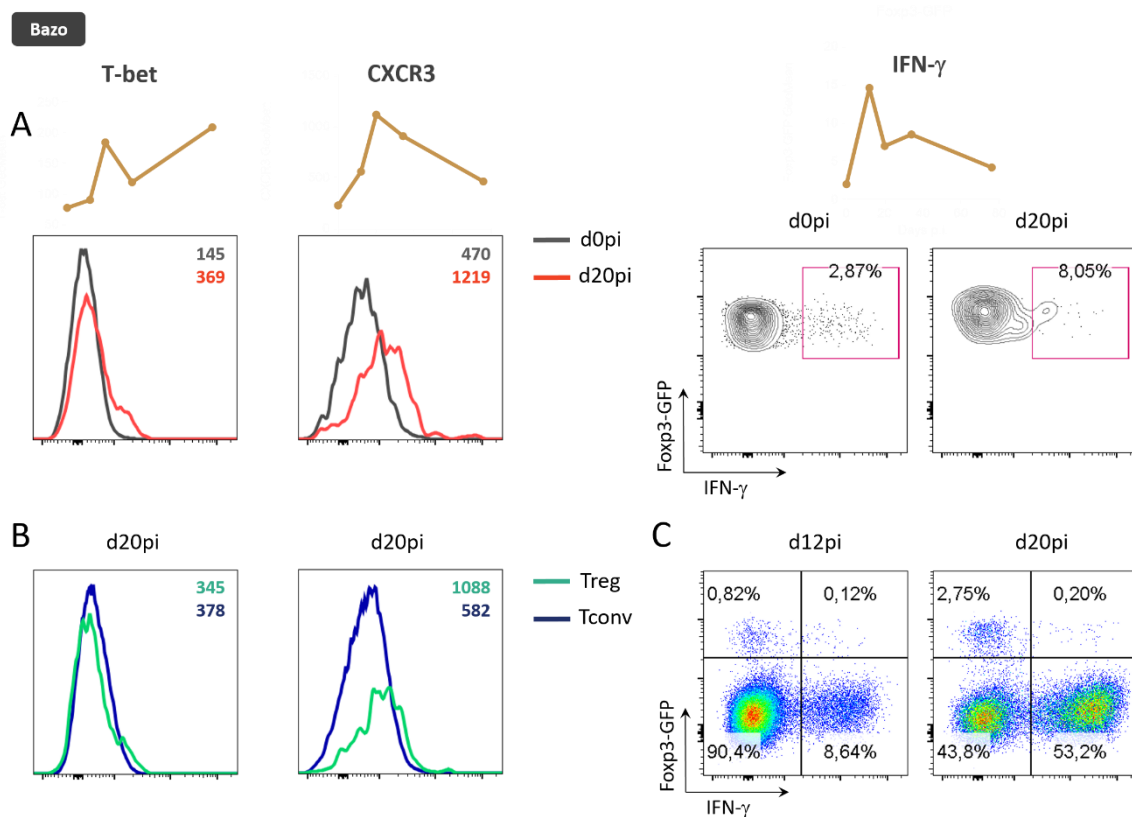
**Figura 23: Las células Treg esplénicas exhiben un perfil mixto central / efector durante la infección con *T. cruzi*.**

Gráficos de citometría de flujo representativos de la expresión de CD62L, CD44, CCR7 y CD103 en la población de células Treg de bazo de ratones Foxp3-GFP no infectados (d0pi) o al d20pi. Los números dentro de los gráficos indican el porcentaje de células positivas (CD62L y CD103) o la media geométrica del nivel de expresión (CD44 y CCR7). Las líneas doradas sobre los histogramas muestran la variación en la media geométrica o en el porcentaje a lo largo de la infección en los días 0, 12, 20, 34 y 76 pi. Los datos son presentados como el promedio de un *n* de 2 a 11 animales correspondientes a 1 ó 2 experimentos independientes según el dpi y el marcador.



del factor de transcripción T-bet aumenta considerablemente a partir del d20pi, mientras que la del receptor de quemoquinas CXCR3 registra un pico de expresión en este momento para luego disminuir paulatinamente. En cuanto al porcentaje de células Treg IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, se observa la mayor frecuencia al d12pi (figura 24A, paneles a la derecha), momento que coincide con los mayores niveles de esta citoquina detectados en sangre (figura 12). Por otra parte, resulta interesante comparar la expresión de estos tres marcadores con respecto a las células efectoras Tconv, a modo de estudiar el grado de similitud con las respuestas Th1. Al d20pi, las células Treg expresaron niveles similares o levemente inferiores de T-bet y mayores niveles de CXCR3 que las células Tconv (figura 24B). Finalmente, se determinó que la proporción de células Treg capaces de producir IFN- $\gamma$  fue despreciable en relación al de las Tconv en los días 12 y 20 pi (Figura 24C).

Con el fin de realizar un análisis más global de las variaciones fenotípicas y



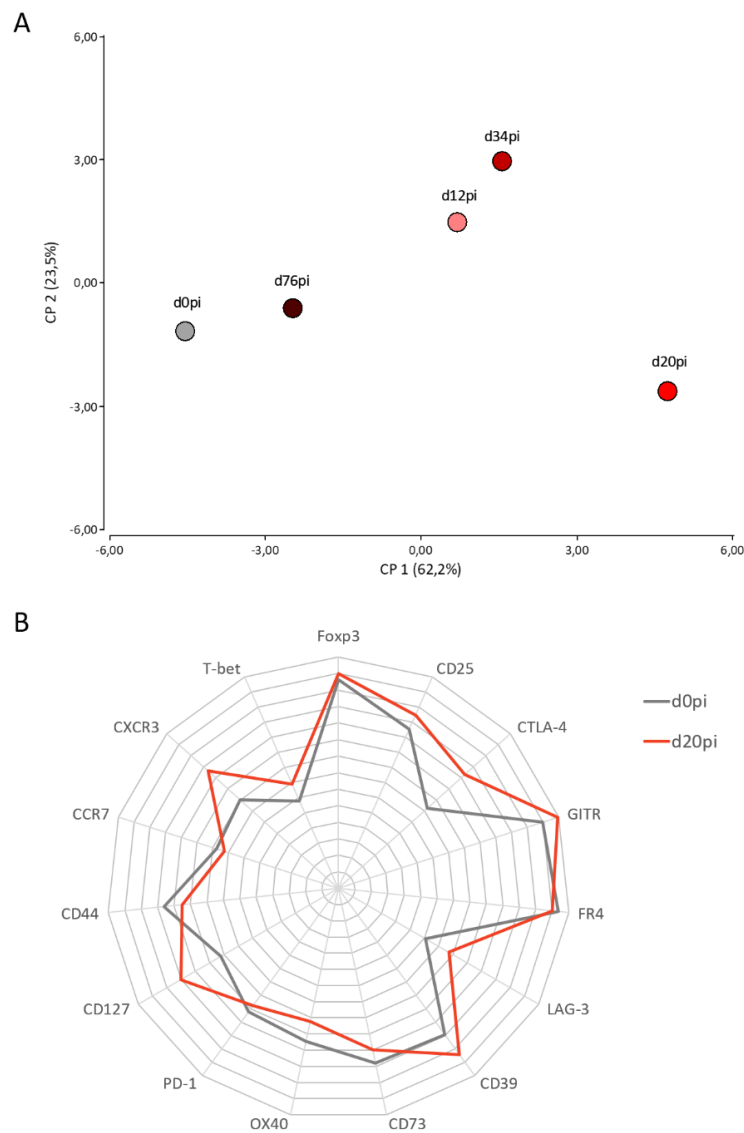
**Figura 24: Las células Treg esplénicas adquieren un perfil Th1-like durante la infección con *T. cruzi*.**

**A-C)** Gráficos de citometría de flujo representativos de la expresión de T-bet y CXCR3, y de la producción de IFN- $\gamma$  determinada en células Treg, Tconv o linfocitos T CD4<sup>+</sup> totales de bazo de ratones Foxp3-GFP a diferentes tiempos de infección. En A) se analizan las células Treg de animales no infectados (d0pi) o al d20pi; mientras que en B) se comparan células Treg y Tconv al d20pi; y en C) se representan linfocitos T CD4<sup>+</sup> en los días 12 y 20 pi. Los números dentro de los gráficos indican la media geométrica del nivel de expresión o el porcentaje de células de cada "gate". Las líneas doradas sobre los gráficos en A) muestran la variación en la media geométrica o en el porcentaje a lo largo de la infección en los días 0, 12, 20, 34 y 76 pi. Los datos son representativos de un *n* de 3 a 11 animales correspondientes a 1 ó 2 experimentos independientes según el dpi.

funcionales inducidas en las células Treg por la infección con *T. cruzi*, se realizó un análisis multiparamétrico de la expresión de los diferentes marcadores estudiados en las células Treg. En primera instancia se realizó un análisis de componentes principales. En la figura 25A se observa que las células Treg esplénicas de los diferentes momentos de la fase aguda se ubicaron en tres grupos bien marcados. El primer grupo es el de las células Treg de animales no infectados y del d76pi, lo cual indica que a este momento de la infección las Treg son bastante similares a las del estado de reposo o fuera del contexto inflamatorio. El segundo grupo corresponde a las células Treg de los días 12 y 34 pi, y el tercero y más alejado del primero, a las del d20pi. Esto indicaría que a medida que transcurre la infección, las células Treg experimentan cambios fenotípicos que en conjunto alcanzan un máximo de variabilidad al d20pi, y que a medida que transcurre la fase aguda temprana hacia momentos más tardíos de la infección cercanos a la fase crónica, el fenotipo de estas células se restablece a condiciones comparables a las de animales no infectados. Considerando esto, en segunda instancia se realizó un gráfico de estrella que ilustra en la expresión de marcadores presentados por las células Treg del d20pi en relación a las provenientes de animales no infectados. Así, los cambios más importantes se observaron en torno al incremento de CTLA-4, CD127 y CXCR3, y en menor medida de CD39, LAG-3 y CD25 (figura 25B). Dados los roles biológicos de estas moléculas, este análisis sugiere que los principales mecanismos supresores que ejercerían las células Treg durante la infección afectan la interacción con células dendríticas y su inhibición de la maduración dada por CTLA-4 y LAG-3, y en menor medida intervendría la disrupción metabólica por parte de CD39 y CD25. También sugieren que IL-7 y la señalización a través de CD127 podría ser importante para la homeostasis de las células Treg en la infección, y que CXCR3 sería esencial para la migración adecuada a sitios de inflamación.

En conjunto estos resultados indican que las células Treg se encuentran en un estado activado durante la infección con *T. cruzi*, dado por el incremento en la expresión de un gran número de moléculas con funcionalidad supresora. Además, es probable que ejerzan esta función tanto en órganos linfoides secundarios como en hígado. Por otro lado, nuestros resultados sugieren que la infección con *T. cruzi* activa las células Treg de forma de promover su capacidad regulatoria sobre células presentadoras de antígenos. Estos resultados señalan también que las células Treg adquieren un perfil Th1-like

durante la infección, el cual se caracteriza por un alto nivel de expresión de CXCR3, incluso en mayor medida que las células Tconv. Esto sugiere que la polarización de las células Treg sería importante para su migración a sitios de inflamación tipo 1 durante esta infección. Por último, las células Treg de animales infectados muestran un fenotipo mixto central y efector, lo cual facilitaría que del conjunto de células Treg, una parte sea capaz de migrar y ejercer su función en órganos linfoides secundarios, mientras que la otra pueda migrar hacia tejidos afectados por la inflamación.



**Figura 25: Análisis multivariado para el nivel de expresión de diferentes marcadores en células Treg esplénicas durante la infección con *T. cruzi*.**

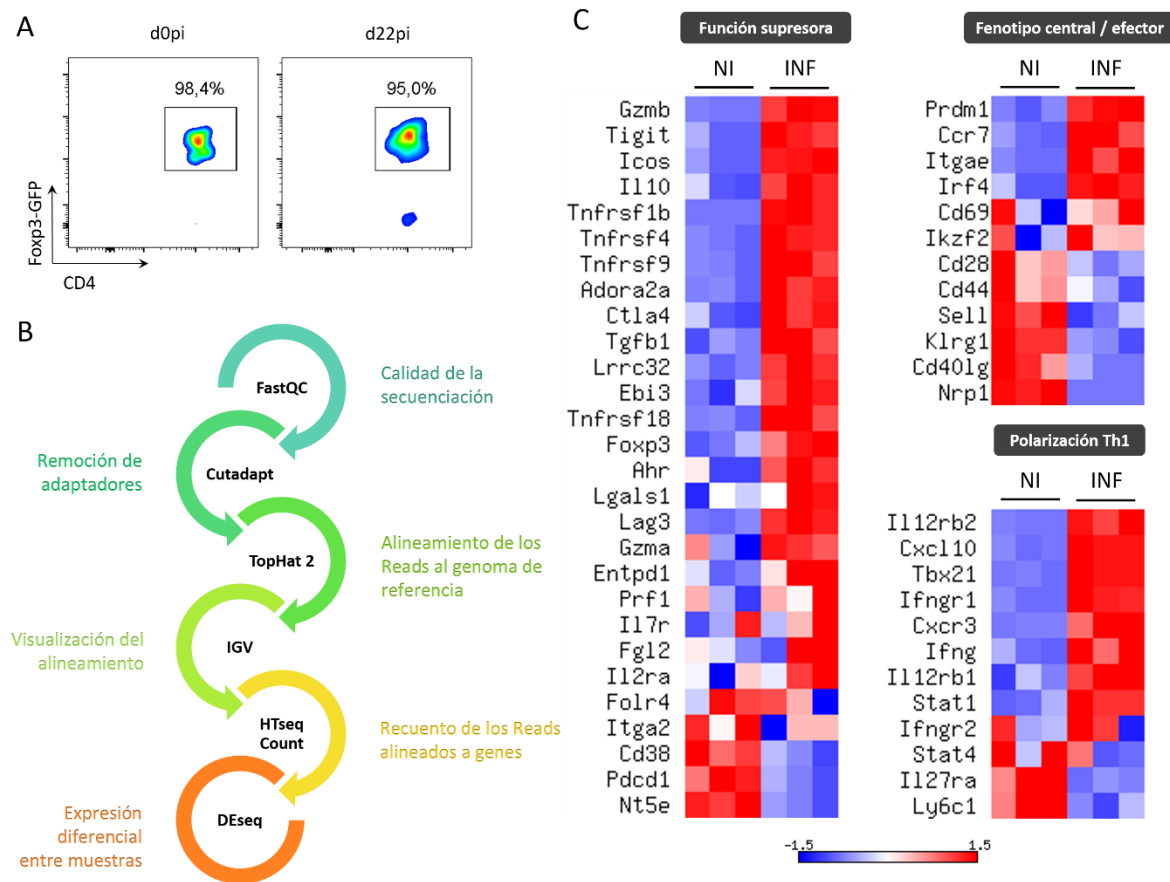
**A)** Análisis de Componentes Principales para el conjunto de datos de expresión de diferentes marcadores de superficie e intracelulares en células Treg esplénicas a diferentes tiempos de infección. **B)** Gráfico estrella que muestra la media geométrica del nivel de expresión del conjunto de marcadores de activación, función supresora, migración y polarización en células Treg de bazo de ratones Foxp3-GFP no infectados (d0pi) o al d20pi. Los datos son representativos de un  $n$  de 3 a 6 animales correspondientes a un experimento para cada dpi.

### *Análisis transcripcional por RNAseq*

Con el fin de profundizar la caracterización de las células Treg, confirmar los resultados obtenidos mediante citometría de flujo y evaluar si existen especializaciones funcionales adicionales de estas células durante la infección, se prosiguió al análisis del programa transcripcional de estas células durante la infección con *T. cruzi*. Para ello se secuenciaron las moléculas de ARN, técnica conocida como RNAseq. Este es un método reciente para el estudio de transcriptomas, el cual presenta ventajas en cuanto a sensibilidad y reproducibilidad con respecto a métodos anteriores, como el uso de microarrays para análisis de expresión [189].

Brevemente, para el desarrollo de esta metodología, se purificaron células Treg de bazo de animales Foxp3-GFP no infectados o al d22pi como ya se describió previamente (figura 26A), luego se extrajo el ARN total de estas muestras y se prepararon librerías de RNAseq. Una vez que las librerías fueron preparadas con éxito, se secuenciaron, y finalmente se realizó el análisis bioinformático de acuerdo al “pipeline” o “workflow” indicado en la figura 26B. De esta forma, se determinaron un total de 5175 genes que presentaron expresión diferencial en las células Treg del d22pi respecto de las provenientes de animales no infectados. Resulta interesante destacar que se encontró a *Tbx21* y *Areg*, genes que codifican para T-bet y anfirregulina, respectivamente, entre los genes cuya expresión se encuentra más significativamente aumentada en las Treg del d22pi.

En primer lugar y a modo de corroborar los resultados previos, se analizaron los niveles de transcritos de los genes evaluados previamente por citometría de flujo, a la vez que se incluyeron genes no estudiados con anterioridad pero que también están relacionados a la función supresora, el perfil central o efector de las células Treg, su estado de activación y la polarización hacia Th1 (figura 26C y tabla 2). En concordancia con los datos obtenidos anteriormente, los resultados del RNAseq confirmaron la existencia de un estado activado de las células Treg inducido por la infección, ilustrado por el gran número de transcritos codificantes de moléculas con funcionalidad supresora que incrementaron sus niveles. Entre ellos, se encontraron aumentados transcritos de moléculas analizadas anteriormente, como por ejemplo OX40, CTLA-4, GITR, IL-10, TGF- $\beta$  y GARP, mientras que también se encontró una alta expresión de los transcritos codificantes para otras moléculas capaces de ejercer efecto regulatorio como Granzima B,



**Figura 26: Perfil transcripcional de las células Treg durante la infección con *T. cruzi*.**

Análisis del transcriptoma de células Treg durante la infección mediante RNAseq. Células Treg ( $CD4^+ CD25^+ Foxp3-GFP^+$ ) se purificaron de bajo de ratones Foxp3-GFP no infectados (NI – d0pi) o al d22pi (INF).

**A)** Gráficos de citometría de flujo representativos del control de pureza posterior a la purificación con perlas y sorting de células Treg. **B)** Esquema del análisis bioinformático de los “Reads” o lecturas secuenciadas. **C)** Gráficos de “heat map” que representan los valores de expresión normalizada para genes relacionados a la función supresora, fenotipo central / efector y activación de células Treg, y polarización a Th1. Los datos del RNAseq corresponden a un experimento con 3 replicados biológicos.

TIGIT y Galectina-1. En contraste, los niveles de los transcritos de CD25, CD127, CD39, FR4 y LAG-3 no se encontraron modificados luego de la infección. En cuanto a la expresión de genes que definen el perfil central – efector de células Treg y el estado activado de linfocitos T, se obtuvieron resultados similares a los de citometría de flujo que denotan un perfil mixto dado por el incremento de expresión de algunos (como CCR7 y CD103, con roles opuestos) y la disminución de expresión de otros (como KLRG-1, CD44 y CD62L) luego de la infección. Resulta notorio remarcar que los transcritos que codifican para los factores de transcripción Blimp-1 e IRF4, responsables de la diferenciación hacia células Treg efectoras [190], incrementaron significativamente sus niveles en las Treg del d22pi respecto a las provenientes de animales no infectados. También es interesante destacar que Nrp1 fue el transcripto más significativamente downregulado en las células

## Resultados I

Treg luego de la infección. Por el contrario, Cd69, Iikzf2 (Helios) y Cd28 no modificaron sus niveles de transcritos. Con respecto a los transcritos involucrados en la diferenciación hacia un perfil Th1-like, se observa un incremento en *Ifng*, *Cxcr3*, *Cxcl10*, *Stat1*, *Il12rb1*, *Il12rb2*, *Ifngr1* y *Tbx21* (T-bet) en las células Treg del d22pi. Siendo el transcritos para T-bet el que presenta mayor expresión diferencial significativa entre las células Treg de ambos grupos experimentales. Por el contrario, con la infección disminuyen los niveles de los transcritos *Il27ra* y *Ly6c1*, que codifican para el receptor de IL-27 y para una molécula que participa en la vía de señalización del mismo, respectivamente. Esto podría indicar que la adquisición del programa transcripcional asociado al control de respuestas Th1 sería inducido por IFN- $\gamma$  e independiente de la señalización por IL-27 en la infección con *T. cruzi*.

Gen	Proteína	Expresión d0pi	Expresión d22pi	Valor p	"Fold Change"
<i>Icos</i>	ICOS	2821,4321	8055,6579	1,88741E-25	2,8552
<i>Tnfrsf4</i>	OX40	4555,2939	12692,7745	8,00967E-25	2,7864
<i>Tnfrsf1b</i>	TNFR2	3810,5138	10671,3681	1,66068E-24	2,8005
<i>Gzmb</i>	Granzima B	381,9112	3937,2754	5,48193E-24	10,3094
<i>Tnfrsf9</i>	4-1BB	2125,9167	5356,0622	1,47979E-19	2,5194
<i>Tigit</i>	TIGIT	341,3446	1049,3686	3,45288E-16	3,0742
<i>Adora2a</i>	A2aR	766,4987	1837,1912	6,98998E-15	2,3969
<i>Ctla4</i>	CTLA-4	15670,7285	30945,8191	8,9103E-10	1,9748
<i>Lrrc32</i>	GARP	5022,3066	9706,8251	1,84449E-09	1,9327
<i>Tgfb1</i>	TGF- $\beta$ 1	1058,8482	2062,9160	3,26115E-09	1,9483
<i>Il10</i>	IL-10	1089,6201	3094,1275	1,87489E-08	2,8396
<i>Nt5e</i>	CD73	5422,8399	3023,9948	2,25085E-08	0,5576
<i>Tnfrsf18</i>	GITR	3284,0216	5504,2983	9,88681E-07	1,6761
<i>Foxp3</i>	Foxp3	5196,5784	7708,2748	0,000596287	1,4833
<i>Pdcd1</i>	PD-1	587,6321	369,9334	0,001251778	0,6295
<i>Ebi3</i>	Subunidad de IL-35	99,4239	180,9172	0,008529072	1,8197
<i>Ahr</i>	AHR	514,2386	739,2918	0,015014453	1,4376
<i>Lgals1</i>	Galectina-1	1992,2243	2528,2226	0,059153479	1,2690
<i>Lag3</i>	LAG-3	181,2601	1106,4928	ns	6,1044
<i>Gzma</i>	Granzima A	27,5874	40,0575	ns	1,4520
<i>Entpd1</i>	CD39	681,9946	949,4601	ns	1,3922
<i>Prf1</i>	Perforina	118,9553	150,9102	ns	1,2686
<i>Il7r</i>	CD127	3721,0035	4235,8113	ns	1,1384
<i>Fgl2</i>	FGL2	608,7981	677,2499	ns	1,1124
<i>Il2ra</i>	CD25	4114,1942	4537,9035	ns	1,1030
<i>Folr4</i>	FR4	5081,2948	4839,2580	ns	0,9524

<i>Itga2</i>	CD49b	80,6351	60,0366	ns	0,7445
<i>Cd38</i>	CD38	236,6348	123,2769	ns	0,5210
<i>Nrp1</i>	Neuropilina-1	6131,8573	1406,9587	2,27E-46	0,2295
<i>Prdm1</i>	Blimp-1	459,7177	1444,9493	1,68E-22	3,1431
<i>Ccr7</i>	CCR7	4177,4193	12979,4874	3,76E-18	3,1071
<i>Itgae</i>	CD103	1359,1821	2979,8267	7,82E-13	2,1924
<i>Cd40lg</i>	CD40L	131,8007	46,1503	3,66E-06	0,3502
<i>Klrg1</i>	KLRG-1	615,9711	220,9230	2,82E-05	0,3587
<i>Sell</i>	CD62L	9756,9420	5256,4296	6,70E-05	0,5387
<i>Irf4</i>	IRF4	1815,8652	3888,8871	0,003377801	2,1416
<i>Cd44</i>	CD44	2342,4944	1719,5901	5,15E-02	0,7341
<i>Cd69</i>	CD69	6983,6443	7859,0094	ns	1,1253
<i>Ikzf2</i>	Helios	15393,7122	16985,7012	ns	1,1034
<i>Cd28</i>	CD28	10243,7398	7862,4954	ns	0,7675
<i>Tbx21</i>	T-bet	106,7694	753,4045	6,64611E-54	7,0564
<i>Il12rb2</i>	Subunidad de IL12R	11,0136	497,3014	1,16063E-48	45,1533
<i>Cxcl10</i>	CXCL10	178,7463	1520,6977	1,40776E-27	8,5076
<i>Ifngr1</i>	Cadena $\alpha$ de IFNGR	5774,1155	16361,4219	1,32897E-25	2,8336
<i>Ifng</i>	IFN- $\gamma$	244,0230	574,8578	4,80579E-09	2,3558
<i>Cxcr3</i>	CXCR3	616,3928	1459,8757	8,15605E-08	2,3684
<i>Stat1</i>	STAT-1	12119,2825	20088,1430	2,55127E-06	1,6575
<i>Il12rb1</i>	Subunidad de IL12R	695,5619	1319,7461	8,38535E-06	1,8974
<i>Ly6c1</i>	Ly6c1	949,9327	463,2254	0,001012293	0,4876
<i>Il27ra</i>	Cadena $\alpha$ de IL27R	4504,4829	3233,1913	0,003832253	0,7178
<i>Ifngr2</i>	Cadena $\beta$ de IFNGR	825,3196	881,3164	ns	1,0678
<i>Stat4</i>	STAT-4	2291,4032	2082,4468	ns	0,9088

**Tabla 2: Expresión Diferencial de Genes en las células Treg luego de la infección con *T. cruzi*.**

Los datos en color gris claro corresponden a genes con un nivel de transcritos <50, considerándose no expresados en estas células.

Expresión d0pi = promedio de expresión para los replicados de NI.

Expresión d22pi = promedio de expresión para los replicados del d22pi.

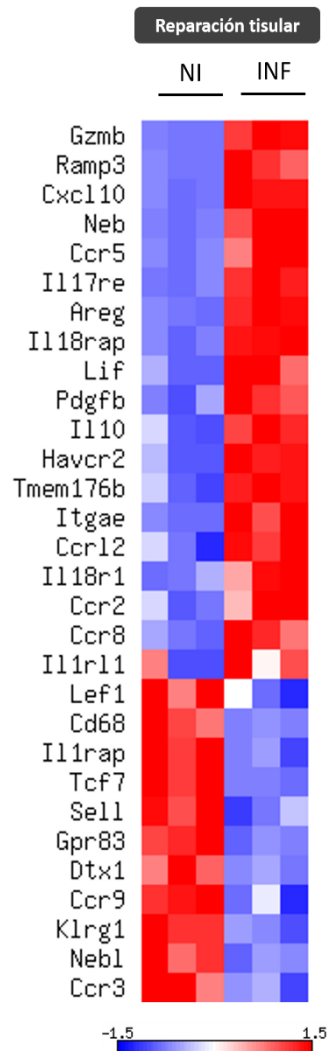
Valor p = valor p ajustado para múltiples pruebas con el procedimiento de Benjamini–Hochberg.

“Fold Change” = veces de cambio

ns = no significativo

En segundo lugar, se prosiguió a profundizar sobre el incremento tan significativo en el transcrito de *Areg* en las células Treg luego de la infección. Como se mencionó previamente, el gen *Areg* codifica para anfirregulina, un factor de crecimiento producido, entre otras células, por células Treg tisulares y que es crítico para el proceso de reparación tisular del músculo esquelético luego de injuria estéril o de distrofia muscular [101], así como también durante el daño pulmonar producido por la infección con virus

de influenza [191]. Por consiguiente, teniendo en cuenta que el daño tisular es una característica importante de la infección por *T. cruzi*, se evaluó si las células Treg adquieren el programa transcripcional característico relacionado a la reparación de tejidos durante esta infección. Para ello, se examinaron los niveles de diversos



**Figura 27: Las células Treg adquieren un programa transcripcional especializado en la reparación tisular durante la infección con *T. cruzi*.**

Gráfico de “heat map” para la expresión normalizada de genes relacionados a células Treg especializadas en reparación tisular. Los datos corresponden a un experimento con 3 replicados biológicos.

transcriptos asociados a las subpoblaciones de células Treg musculares y pulmonares con capacidad reparadora (figura 27 y tabla 3). Las proteínas que codifican estos transcriptos corresponden en general a factores de crecimiento, receptores de quemoquinas, moléculas involucradas en la migración celular y factores de transcripción, así como también a proteínas asociadas al fenotipo de célula Treg efectora y moléculas secretadas con funcionalidad supresora o anti-inflamatoria.

Como se comentó previamente, Areg es uno de los transcriptos que incrementó más significativamente sus niveles en células Treg del d22pi respecto de las obtenidas de animales no infectados. Además de Areg, el transcripto codificante para el factor de crecimiento PDGFB se upreguló en las Treg luego de la infección, así como también el de Nebulina, una proteína de la matriz extracelular sarcomérica. De forma interesante, los transcriptos de Il18r1 e Il18rap que codifican para el receptor de IL-18 (IL-18R), involucrado en la supervivencia de las células Treg tisulares (ver abajo), incrementaron significativamente sus niveles en las células Treg del d22pi respecto de las de no infectados. La infección también incrementó el nivel del transcripto para Ccr2, lo cual resulta relevante ya que su ligando MCP-1 ejerce un efecto quimiotáctico en el tráfico leucocitario hacia tejidos. Por el contrario, las células Treg del d22pi mostraron reducción en los niveles de transcriptos de Nbl (Nebulette, proteína necesaria junto a Nebulina para



el desarrollo y remodelado de miofibrillas de músculo estriado [192]), y de *Il1rap*, mientras que no se modificaron los niveles de *Il1rl1*, en relación a las Treg de animales no infectados. Estos dos últimos genes codifican para IL-1RAP y ST2, respectivamente, que en conjunto forman el receptor de IL-33. Es importante destacar que IL-33 junto con IL-18 son las señales reportadas para la inducción de la expresión de Anfirregulina, y, mientras que la expresión del receptor ST2 en células Treg fue descrito en condiciones de daño tisular estéril [101], la expresión de IL-18R promueve la función de reparación tisular durante la infección con virus de influenza [191]. En este sentido, de acuerdo al nivel de expresión de sus receptores, la señalización a través de IL-18 parecería ser más relevante que la de IL-33 en las células Treg durante la infección con *T. cruzi*. Por último, algunos transcritos que disminuyeron sus niveles en las células Treg de reparación tisular también se vieron reducidos en las células Treg esplénicas luego de la infección con *T. cruzi*, como por ejemplo *Dtx1*, *Gpr83*, *Tcf7*, *Sell*, *Cd68* y *Ccr9*.

En conjunto, los resultados de la caracterización transcripcional de las células Treg refuerzan los obtenidos previamente mediante citometría de flujo, indicando que la infección con *T. cruzi* incrementa en estas células la expresión de gran cantidad de moléculas con función supresora, a la vez que modifica las propiedades migratorias de las mismas, e induce la adquisición de programas especializados en controlar las respuestas inflamatorias tipo 1 y promover la reparación tisular.

Resultados I

Gen	Proteína	Expresión d0pi	Expresión d22pi	Valor p	“Fold Change”
<i>Areg</i>	Anfirregulina	458,8317	2562,1054	1,27165E-53	5,5840
<i>Cxcl10</i>	CXCL10	178,7463	1520,6977	1,40776E-27	8,5076
<i>Neb</i>	Nebulina	3488,5927	24458,2099	3,78366E-26	7,0109
<i>Gzmb</i>	Granzima B	381,9112	3937,2754	5,48193E-24	10,3094
<i>Ccr5</i>	CCR5	131,0445	894,3721	1,75197E-23	6,8249
<i>Il17re</i>	IL17RE	181,2601	1106,4928	9,71538E-19	6,1044
<i>Itgae</i>	CD103	1359,1821	2979,8267	7,8212E-13	2,1924
<i>Ramp3</i>	RAMP3	109,0869	1072,0544	4,64655E-11	9,8275
<i>Havcr2</i>	TIM-3	86,1068	229,8373	1,80928E-10	2,6692
<i>Gpr83</i>	GPR83	2276,0934	1145,6909	4,64211E-10	0,5034
<i>Il18rap</i>	Proteína accesoria del IL18R	212,0877	842,1816	1,06882E-08	3,9709
<i>Il10</i>	IL-10	1089,6201	3094,1275	1,87489E-08	2,8396
<i>Nebi</i>	Nebulette	136,7584	46,5375	1,00442E-06	0,3403
<i>Ccr12</i>	CCRL2	517,5979	916,3949	1,39236E-06	1,7705
<i>Klrg1</i>	KLRG-1	615,9711	220,9230	2,8216E-05	0,3587
<i>Lif</i>	LIF	80,9074	244,5489	0,000313741	3,0226
<i>Pdgfb</i>	PDGFB	26,1647	78,9157	0,000369875	3,0161
<i>Dtx1</i>	DTX1	3404,1737	1705,2809	0,000698085	0,5009
<i>Tmem176b</i>	Proteína transmembrana 176B	33,5351	78,5916	0,000863949	2,3436
<i>Il18r1</i>	IL18R1	942,1701	1582,1631	0,004260986	1,6793
<i>Il1rap</i>	Proteína accesoria del IL1R	349,2415	225,6561	0,008035079	0,6461
<i>Ccr3</i>	CCR3	117,1311	23,6268	0,01267375	0,2017
<i>Ccr2</i>	CCR2	1268,7938	2025,1710	0,025551086	1,5961
<i>Ccr9</i>	CCR9	178,5373	86,3334	0,027274176	0,4836
<i>Cd68</i>	CD68	148,3714	98,0762	6,30E-02	0,6610
<i>Tcf7</i>	TCF7	3812,7221	2194,4011	7,53E-02	0,5755
<i>Ccr8</i>	CCR8	893,7939	2358,9635	ns	2,6393
<i>Il1rl1</i>	ST2, receptor de IL-33	473,2291	611,2101	ns	1,2916
<i>Lef1</i>	LEF1	2935,0568	2227,8987	ns	0,7591

**Tabla 3: Expresión Diferencial de Genes asociados al programa de reparación tisular en células Treg luego de la infección con *T. cruzi*.**

Los datos en color gris claro corresponden a genes con un nivel de transcritos <50, considerándose no expresados en estas células.

Expresión d0pi = promedio de expresión para los replicados de NI.

Expresión d22pi = promedio de expresión para los replicados del d22pi.

Valor p = valor p ajustado para múltiples pruebas con el procedimiento de Benjamini–Hochberg.

“Fold Change” = veces de cambio

ns = no significativo

*Análisis funcional mediante ensayos de supresión in vitro*

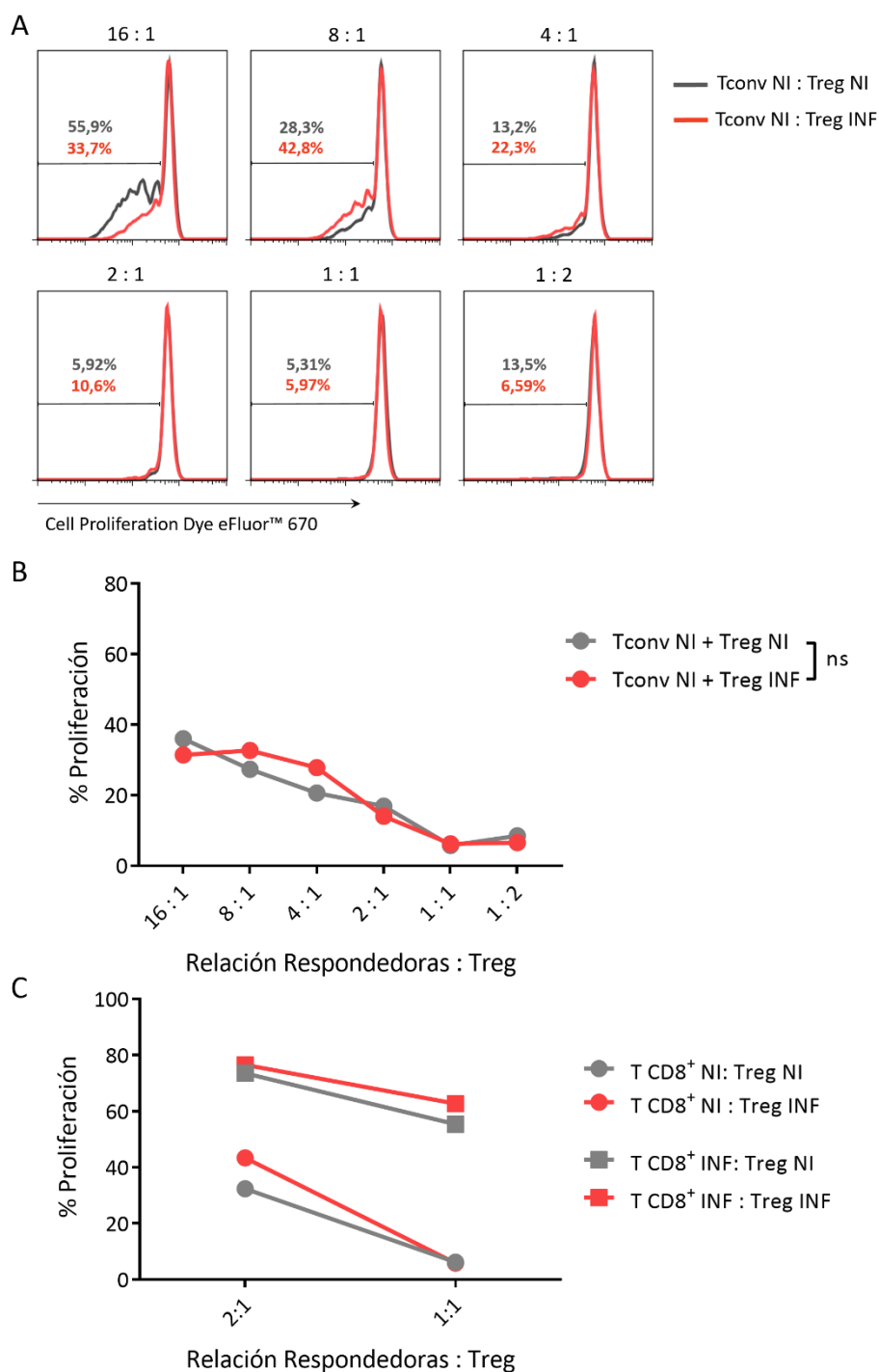
Los resultados de la caracterización fenotípica y transcripcional indican que durante la infección con *T. cruzi* las células Treg se encuentran activadas, y presentan una alta expresión de moléculas de superficie con actividad supresora y un incremento en la capacidad de sintetizar citoquinas y moléculas anti-inflamatorias en relación a las células Treg de animales no infectados. Como se mencionó anteriormente, este estado considerablemente activado podría incrementar su función supresora durante la infección, compensando así la reducción de su frecuencia en periferia. Para poner esto a prueba, se evaluó la funcionalidad de las células Treg mediante ensayos de supresión de la proliferación *in vitro* [193]. Los mismos consisten en co-cultivar células Treg con células respondedoras en distintas relaciones, para luego evaluar la proliferación de estas últimas, la cual se verá inhibida a medida que se incremente la proporción de células Treg. En este sentido, en nuestros experimentos se utilizaron células respondedoras purificadas a partir de bazo de ratones Foxp3-GFP y se marcaron con el colorante Cell Proliferation Dye eFluor™ 670, que permite monitorear la división celular a fin de evaluar su proliferación. A continuación, las células respondedoras teñidas se cultivaron con células Treg provenientes de bazo de animales Foxp3-GFP infectados, o no infectados como control. Todos los ensayos de supresión se realizaron en presencia de anti-CD3 y anti-CD28 como estímulo policlonal para la proliferación de las células respondedoras. Luego de cuatro días de cultivo en estas condiciones, se analizó mediante citometría de flujo el porcentaje de células respondedoras que proliferaron luego del estímulo policlonal en presencia de células Treg de animales infectados y no infectados.

En un primer momento, se utilizaron las células respondedoras clásicas para estos ensayos, es decir células Tconv purificadas de animales no infectados. Como muestran las figuras 28 A y B, a medida que se incrementa la proporción de células Treg va disminuyendo el porcentaje de células respondedoras Tconv que proliferan, de acuerdo a lo esperado. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la capacidad de suprimir la proliferación de las respondedoras entre las células Treg provenientes de animales infectados respecto de las de no infectados. En una segunda instancia, se evaluó si la infección con *T. cruzi* incrementa la capacidad supresora de las células Treg frente a poblaciones celulares distintas a Tconv. En este sentido, en los siguientes experimentos se utilizaron además de células Tconv, linfocitos T CD8<sup>+</sup> como células respondedoras. Se

eligieron estas células ya que en los resultados previos se observó correlación inversa entre la frecuencia de células Treg y la de linfocitos citotóxicos específicos para *T. cruzi* (figura 15). Adicionalmente, las células respondedoras empleadas se purificaron tanto de animales no infectados como infectados, con el fin de analizar si la infección provee a las células respondedoras una sensibilidad diferencial a ser suprimidas por células Treg provenientes del mismo contexto inflamatorio. Como se observa en la figura 28 C, en estos ensayos tampoco se observaron diferencias en la capacidad de las células Treg de ambos grupos en inhibir la proliferación de células T CD8<sup>+</sup>, ya sean células respondedoras obtenidas de animales no infectados como purificadas de ratones infectados.

Por último, al cuarto día de cultivo, se determinó por citometría de flujo no solo el porcentaje de proliferación de las células respondedoras Tconv y T CD8<sup>+</sup>, sino también su capacidad de producir IFN- $\gamma$ . Como se muestra en la figura 29, al analizar el porcentaje de células Tconv IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, se observa que las células Treg de ambos grupos inhibieron de forma muy similar la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células respondedoras.

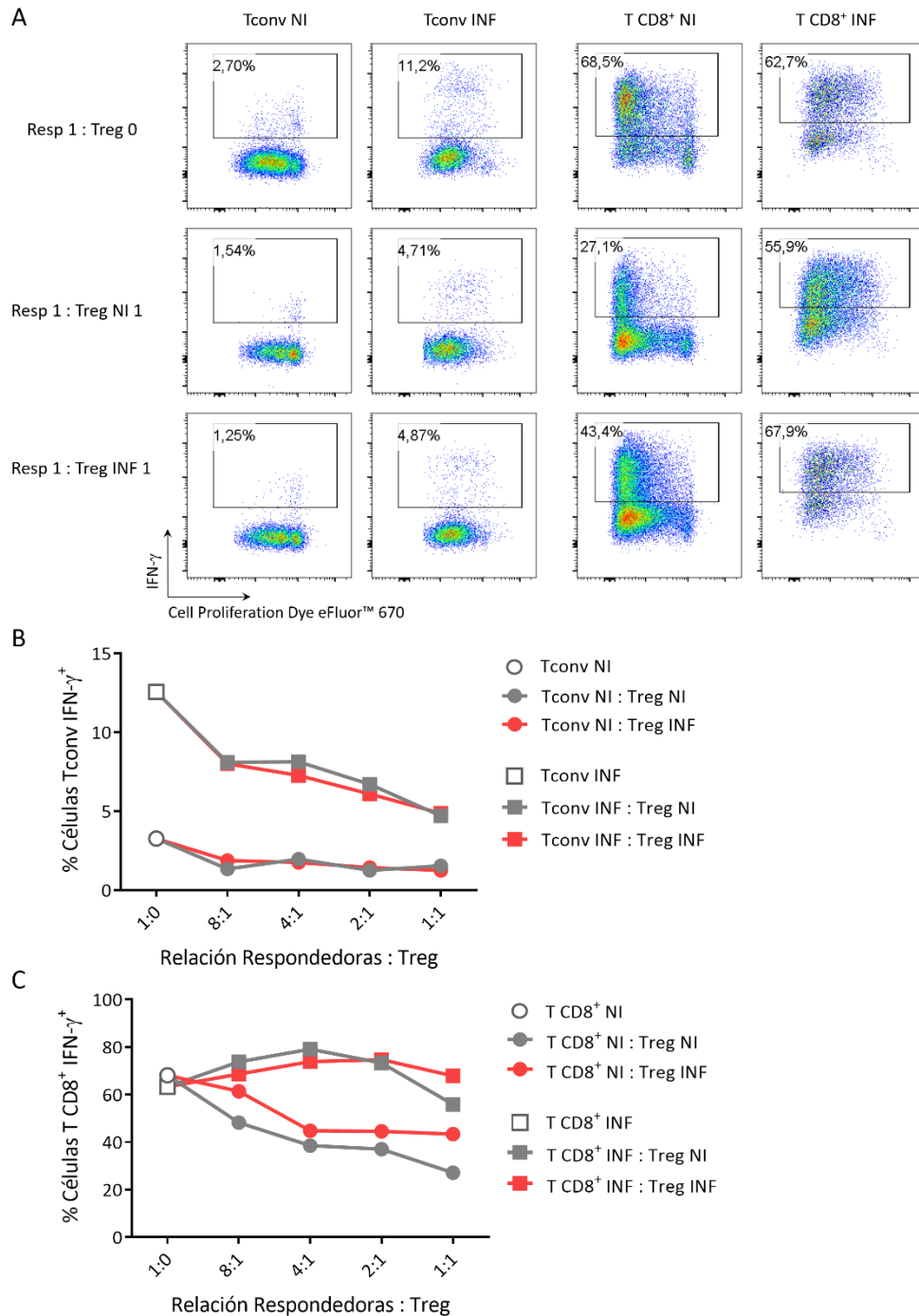
Estos resultados sugieren que, contrariamente a lo esperado, la infección con *T. cruzi* no promueve en las células Treg una funcionalidad superior en su capacidad de frenar la proliferación y la producción de IFN- $\gamma$  por parte de linfocitos Tconv y T CD8<sup>+</sup> *in vitro*. Asimismo, la capacidad supresora de las células Treg no estaría afectada por el contexto inflamatorio del cual se obtuvieron las células respondedoras.



**Figura 28: Las células Treg de animales infectados con *T. cruzi* no incrementan su función supresora de la proliferación *in vitro*.**

Ensayo de supresión de la proliferación *in vitro*. Células Tconv ( $CD4^+$  Fxp3-GFP<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>) y linfocitos T CD8<sup>+</sup> se purificaron de bazo de ratones Fxp3-GFP NI o al d19pi, se marcaron con el colorante Cell Proliferation Dye eFluor™ 670 y se co-cultivaron en diferentes relaciones con células Treg ( $CD4^+$  Fxp3-GFP<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) obtenidas de ratones Fxp3-GFP NI o INF al d18-19pi, en presencia de anti-CD3 y anti-CD28. Luego de cuatro días, se analizó mediante citometría de flujo la dilución del colorante en las células respondedoras Tconv. **A-B)** Se muestran gráficos de citometría de flujo representativos, indicando el porcentaje de células respondedoras que proliferaron (A) y el gráfico de líneas correspondiente (B). **C)** Gráfico que muestra el porcentaje de células respondedoras T CD8<sup>+</sup> que proliferaron. Para purificar cada población celular se partió de un conjunto de 4 a 10 animales. Los datos son presentados como el promedio de duplicados técnicos para cada relación en B), y son representativos de 3 experimentos independientes en B) y de 2 en C). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías. ns = no significativo.

## Resultados I



**Figura 29: Las células Treg de animales infectados con *T. cruzi* no incrementan su función supresora de la producción de IFN- $\gamma$  *in vitro*.**

Ensayo de supresión de la proliferación y de la producción de IFN- $\gamma$  *in vitro*. Células Tconv (CD4<sup>+</sup> Foxp3-GFP<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>) y linfocitos T CD8<sup>+</sup> se purificaron de bazo de ratones Foxp3-GFP NI o al d19pi, se marcaron con el colorante Cell Proliferation Dye eFluor™ 670 y se co-cultivaron en diferentes relaciones con células Treg (CD4<sup>+</sup> Foxp3-GFP<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) obtenidas de ratones Foxp3-GFP NI o INF al d19pi, en presencia de anti-CD3 y anti-CD28. Luego de cuatro días, se analizó mediante citometría de flujo la dilución del colorante y la producción de IFN- $\gamma$  en las células respondedoras. **A)** Gráficos representativos de citometría de flujo que indican el porcentaje de células respondedoras productoras de IFN- $\gamma$  en la relación 1 : 1 o en los controles sin células Treg (relación 1 : 0). **B-C)** Gráficos que muestran el porcentaje de células respondedoras Tconv (B) y T CD8<sup>+</sup> (C) productoras de IFN- $\gamma$  en todas las relaciones. Para purificar cada población celular se partió de un conjunto de 5 a 10 animales. Los datos corresponden a una única muestra para cada relación, de un único experimento para respondedoras Tconv y son representativos de 2 experimentos independientes para respondedoras T CD8<sup>+</sup>.

## Conclusiones

En resumen, los resultados presentados en la primera parte de este trabajo indican que durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*:

- La proporción de células Treg respecto a Tconv y a leucocitos totales se reduce en órganos linfoides periféricos (bazo y GLI), sangre, médula ósea e hígado; mientras que en GLM se incrementa tempranamente y luego retorna a valores normales, y en timo aumenta al pico de la infección, recuperándose hacia finales de la fase aguda.
- La reducción de la frecuencia de células Treg en bazo se correlaciona inversamente con el incremento de la parasitemia y de diferentes marcadores bioquímicos de daño, al igual que con el surgimiento de la respuesta efectora de citoquinas pro-inflamatorias en sangre y de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para *T. cruzi* en bazo.
- Variaciones en la carga infectiva de tripomastigotes aceleran la cinética de disminución de la frecuencia de células Treg en bazo pero no la magnitud del fenómeno, que alcanza siempre un mínimo al d20pi.
- La reducción en la frecuencia de células Treg en periferia se debería, al menos en parte, a una disminución marcada de la generación de células Treg en periferia y a una baja tasa de proliferación de las células Treg esplénicas en comparación con otras poblaciones celulares de bazo.
- La disminución de la proporción de células Treg en periferia no sería consecuencia de un desarrollo atenuado en timo ni de la apoptosis de estas células en bazo, y es independiente de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1 e IL-18.
- Las células Treg exhiben un fenotipo activado en periferia con capacidad de producir citoquinas supresoras y migrar hacia sitios inflamatorios, y adquieren programas especializados en el control de respuestas Th1 y en la reparación tisular.
- La infección no afecta la capacidad supresora *in vitro* de las células Treg sobre la proliferación y la producción de IFN- $\gamma$  por células Tconv y T CD8<sup>+</sup>.

Estos resultados muestran que durante la infección aguda con *T. cruzi*, la respuesta de células T regulatorias Foxp3<sup>+</sup> es superada en magnitud por la respuesta efectora, como consecuencia de la baja tasa de proliferación de las células Treg respecto de las poblaciones efectoras y de la generación limitada de células Treg luego de la





## Resultados I

infección. Asimismo, si bien las células Treg están activadas durante la infección y exhiben un fenotipo adecuado para el control de las respuestas inflamatorias y la reparación tisular, su función supresora *in vitro* no se ve incrementada. En consecuencia, la reducción en la frecuencia de células Treg en periferia podría comprometer el control global de las respuestas efectoras, así como también la reparación de los tejidos dañados como consecuencia de la infección.



# RESULTADOS II

## RELEVANCIA BIOLÓGICA DE LAS CÉLULAS T REGULATORIAS DURANTE LA INFECCIÓN CON *T. CRUZI*

-  Efecto del tratamiento con atRA *in vivo* durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*
-  Impacto del incremento en los números de células Treg durante la infección con *T. cruzi* por transferencia adoptiva de células iTreg
-  Efecto de la disminución en los números de células Treg luego de la eliminación específica durante la infección con *T. cruzi*
-  Conclusiones



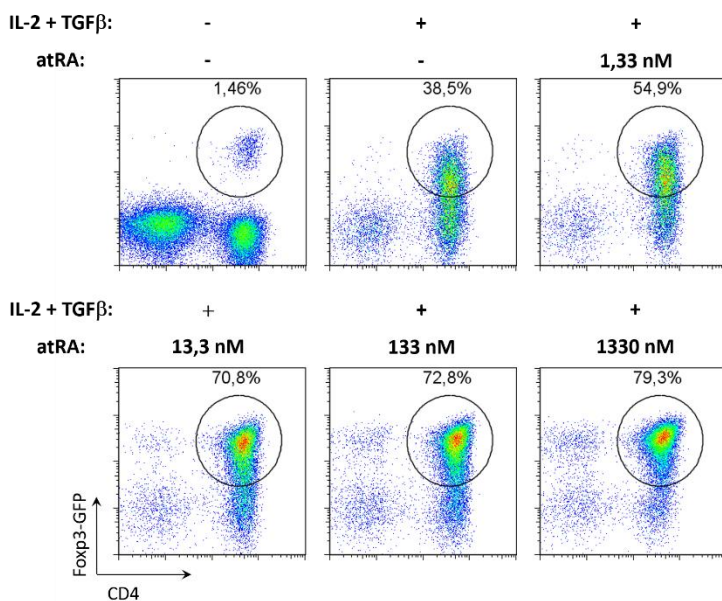
Los resultados expuestos hasta el momento demuestran que durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*, la respuesta regulatoria cursa con una reducción periférica de la frecuencia de células Treg, que sin embargo se encuentran activadas y con indicios de especialización. En este contexto, y teniendo en cuenta que las células Treg pueden exhibir efectos tanto beneficiosos como perjudiciales en las infecciones, los estudios que se llevaron a cabo a continuación tuvieron como objetivo evaluar la importancia biológica de la disminución en la frecuencia de estas células. En este sentido, se propusieron diferentes estrategias con el fin de manipular el desarrollo de la respuesta de células Treg y los números de estas células durante la infección con *T. cruzi*, a modo de determinar el efecto que esto conlleva sobre la respuesta inmune efectora, el control de la replicación parasitaria y el desarrollo de daño tisular.

### Efecto del tratamiento con atRA *in vivo* durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*

El ácido retinoico, metabolito de la vitamina A dietaria, es un modulador pleiotrópico del sistema inmune que actúa en los procesos de diferenciación, activación y migración de leucocitos. En este sentido, los efectos que el ácido retinoico ejerce sobre las células del sistema inmune son variados, e incluso a veces contradictorios, y mientras que en general se asocian al mantenimiento de un estado inmunosupresor, también pueden promover el inicio de respuestas inflamatorias y el desarrollo de inmunidad protectora. Así, los múltiples roles que el ácido retinoico cumple en el sistema inmune dependen tanto de su dosis local e intracelular, como de la expresión de las diferentes isoformas de sus receptores, el tipo celular y el contexto inflamatorio específico [194]. La isoforma de ácido retinoico que predomina en los tejidos es el ácido transretinoico (atRA), cuya fuente principal para el sistema inmune la constituyen las células dendríticas CD103<sup>+</sup>, los macrófagos y las células epiteliales de la mucosa intestinal [194]. En particular, los linfocitos T no producen este metabolito pero sí expresan constitutivamente los receptores para el mismo. Así, una vez que el ácido retinoico se une a estos receptores intracelulares, uno de los efectos más importantes que desencadenan en células T CD4<sup>+</sup> vírgenes es la promoción de la diferenciación del perfil Treg, reforzando

la acción de TGF- $\beta$  al mismo tiempo que inhibe al factor de transcripción ROR $\gamma$ t y por lo tanto, suprime la generación de células Th17 [195-198]. En este contexto, el ácido retinoico sería importante para mantener un estado tolerogénico al inducir la generación de células pTreg en condiciones homeostáticas. Asimismo, este metabolito promueve la diferenciación hacia Treg *in vitro* aún en presencia de citoquinas pro-inflamatorias [199] e *in vivo* bajo condiciones inflamatorias crónicas, donde las células Treg generadas son necesarias para proteger frente al desarrollo de patología [200-202].

Teniendo esto en cuenta, la primera medida adoptada para manipular *in vivo* la respuesta regulatoria durante la infección con *T. cruzi* fue el tratamiento con ácido retinoico a fin de estimular el desarrollo de células pTreg. Para ello, en primer lugar se controló la actividad biológica de este metabolito evaluando su capacidad de inducir células Treg en cultivos *in vitro*, ya que ha sido reportado que en cultivo potencia la diferenciación hacia el perfil regulatorio [203]. Para ello, esplenocitos totales de ratones Foxp3-GFP no infectados se cultivaron en presencia de anti-CD3 y anti-CD28, adicionando al medio de cultivo las citoquinas necesarias para la inducción del perfil Treg: IL-2 y TGF- $\beta$  [204], como así también distintas concentraciones de atRA. Como control negativo, las células se cultivaron en ausencia de citoquinas y/o de atRA. Transcurridos cuatro días de cultivo en estas condiciones, se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de células Treg diferenciadas *in vitro* (iTreg), dado por la inducción de la expresión de Foxp3-GFP en linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Como se observa en la figura 30, el porcentaje de células iTreg obtenido a partir de esplenocitos cuyo medio no fue condicionado fue similar al observado ex-vivo en bazo de ratones sin infectar (figura 6). Como se esperaba de acuerdo a la literatura, las citoquinas IL-2 y TGF- $\beta$  favorecieron la inducción de iTreg, efecto que se vio potenciado por el agregado de atRA. En estas condiciones experimentales *in vitro*, la concentración de atRA de 13,3 nM resultó la óptima, generando el máximo porcentaje de células iTreg, que fue similar al obtenido con concentraciones de atRA diez y cien veces mayores.



**Figura 30: Control *in vitro* de la actividad biológica de atRA en la inducción de células Treg.**

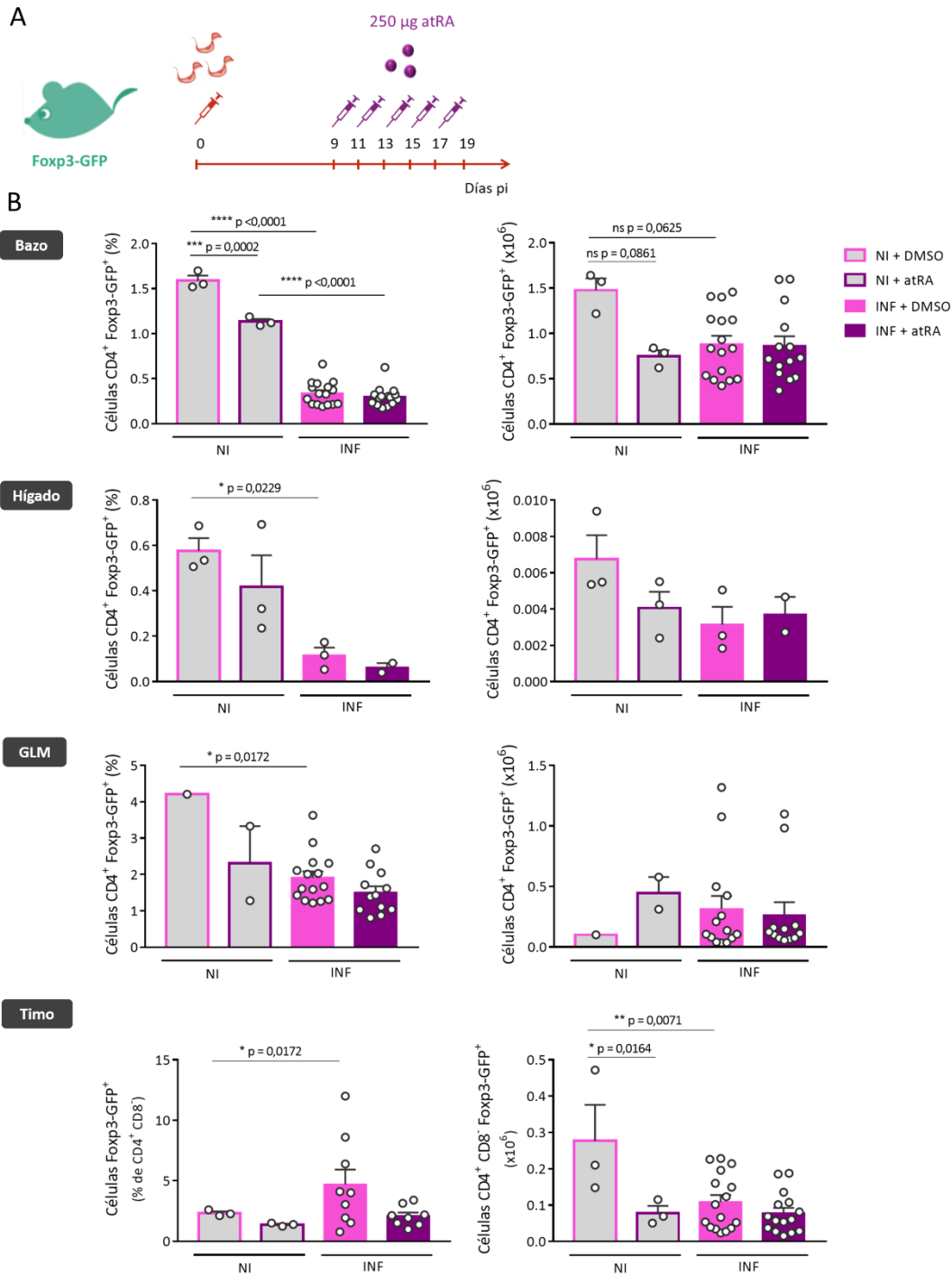
Esplenocitos de ratones Foxp3-GFP no infectados se cultivaron en presencia de anti-CD3 y anti-CD28, adicionando en el medio de cultivo IL-2, TGF-β y distintas concentraciones de atRA según corresponda. Luego de cuatro días, se analizó mediante citometría de flujo el porcentaje de células que se diferenciaron a Treg (CD4<sup>+</sup> Foxp3-GFP<sup>+</sup>). Se muestran gráficos de citometría de flujo representativos de los duplicados técnicos realizados para cada condición.

Una vez controlada su actividad biológica, se administró atRA a ratones Foxp3-GFP infectados mediante inyecciones intraperitoneales realizadas día de por medio a partir del día 9 u 11 pi (INF + atRA). Se eligió este momento para iniciar el tratamiento ya que corresponde al dpi en que comienza la disminución de la frecuencia de células Treg en periferia (figura 6).

Como control se utilizaron ratones inyectados solo con el vehículo (INF + DMSO). Además, se verificó el funcionamiento del tratamiento en condiciones homeostáticas en animales no infectados. El efecto del tratamiento con atRA se evaluó al momento del pico de la infección, cuando la disminución en la frecuencia de células Treg es máxima (d16-19pi) (ver esquema de la figura 31A). Para ello, se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de células Treg y se calcularon sus números absolutos en diferentes órganos linfoides, tanto primarios como secundarios, al igual que en hígado.

De forma sorprendente, el tratamiento con atRA de animales no infectados no reprodujo el incremento en los números de células Treg reportado en bibliografía, e incluso se observó una leve disminución en la frecuencia de células Treg esplénicas y en los números absolutos de células Treg en bazo y timo (figura 31B). Además, en animales infectados dicho tratamiento no modificó la frecuencia ni los números absolutos de células Treg en órganos linfoides secundarios (bazo y GLM), timo e hígado respecto de ratones tratados con el vehículo (figura 31B). Más aún, el tratamiento con atRA no modificó el nivel de expresión de Foxp3 en las células Treg de los diferentes órganos de

## Resultados II



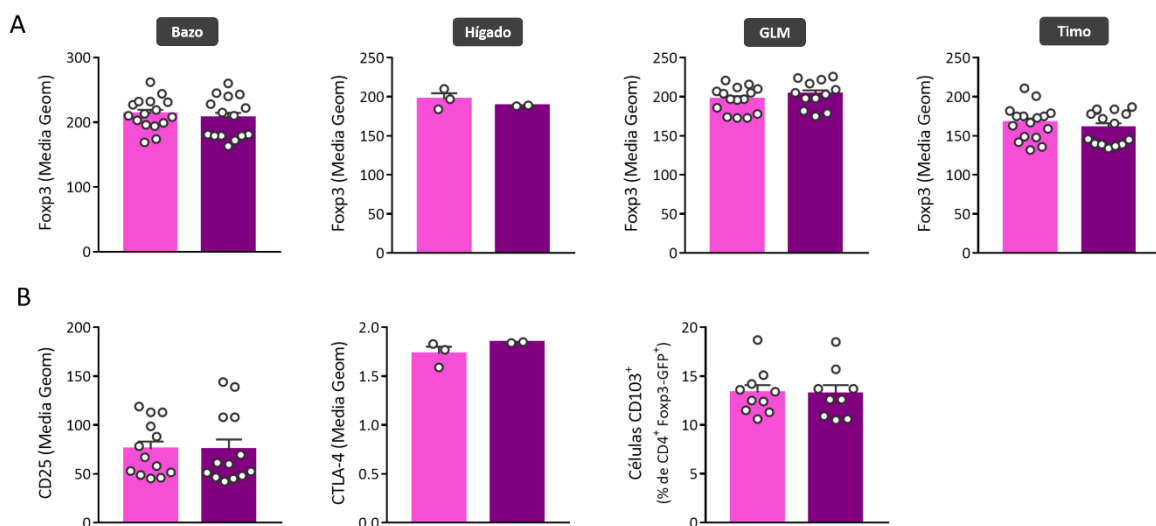
**Figura 31: El tratamiento con atRA no afecta los números de células Treg durante la infección con *T. cruzi*.**

**A)** Ratones Foxp3-GFP infectados o controles sin infectar se trataron o no con 4 ó 5 inyecciones i.p. de atRA (250 µg) o del vehículo (DMSO). Según cada experimento, este tratamiento se realizó día por medio a partir del día 9 u 11 pi, sacrificando los animales entre los días 16 y 19 pi. **B)** Gráficos que muestran la frecuencia (izquierda) y los números absolutos (derecha) de células Treg (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) en diferentes órganos de ratones Foxp3-GFP INF o controles NI, que fueron tratados con DMSO o atRA de acuerdo al esquema en A). Los datos son presentados como promedio + EEM, contando con un *n* de 3 a 16 animales correspondientes a 3 experimentos independientes para animales infectados y a un experimento para no infectados. Los valores *p* fueron calculados mediante ANOVA de una vía y posterior comparación múltiple de Tukey o el correspondiente análisis no paramétrico mediante test de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples de Dunn.

animales infectados con respecto a los controles (figura 32A). Tampoco se vio afectado el estado de activación de las células Treg esplénicas, determinado por el nivel de expresión de CD25 y CTLA-4, ni el porcentaje de estas células que modifican su capacidad migratoria al expresar CD103 (figura 32B).

Si bien no se observaron cambios importantes en la población de células Treg luego del tratamiento con atRA en animales infectados con *T. cruzi*, sí resultó interesante el efecto de este metabolito sobre la progresión de la infección. Como se observa en la figura 33, los niveles de parásitos en sangre disminuyeron significativamente en los ratones que fueron tratados con atRA respecto al grupo inyectado con DMSO. Al estudiar los niveles de marcadores bioquímicos de daño, los niveles de actividad de GOT y GPT no se modificaron luego de la administración de atRA en comparación con los controles.

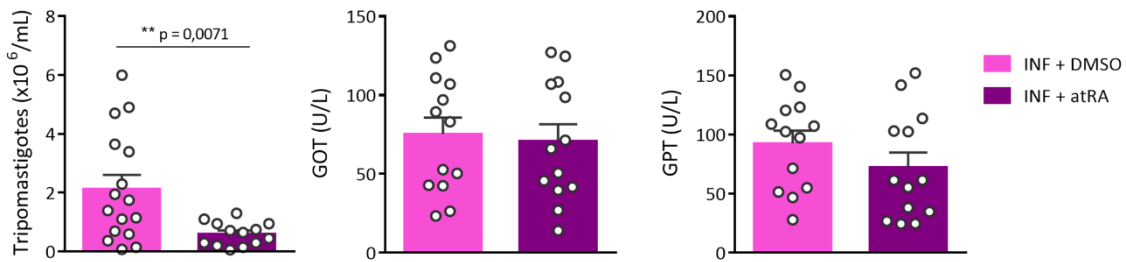
Dado que estos resultados sugieren que el ácido retinoico favorece el control del parásito, a continuación se prosiguió a estudiar el desarrollo de la respuesta efectora antiparasitaria en estos animales. En primer lugar, se estudiaron mediante citometría de flujo los números de diferentes poblaciones celulares efectoras esplénicas importantes en la respuesta adaptativa durante el pico de la infección. La administración de atRA no modificó la frecuencia ni los números absolutos de células Tconv, linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales



**Figura 32: El tratamiento con atRA no afecta el estado de activación de las células Treg durante la infección con *T. cruzi*.**

Gráficos que muestran el nivel de expresión de Fosp3 en células Treg de diferentes órganos (A) y de los marcadores CD25, CTLA-4 y CD103 en células Treg de bazo (B) de ratones Fosp3-GFP infectados tratados con atRA o DMSO de acuerdo al esquema en la figura 31A). Los datos son presentados como promedio + EEM, contando con un *n* de 2 a 16 animales que corresponden de 1 a 3 experimentos independientes según el marcador estudiado. Los valores *p* fueron calculados mediante t-test no apareado, resultando no significativos en todos los casos.

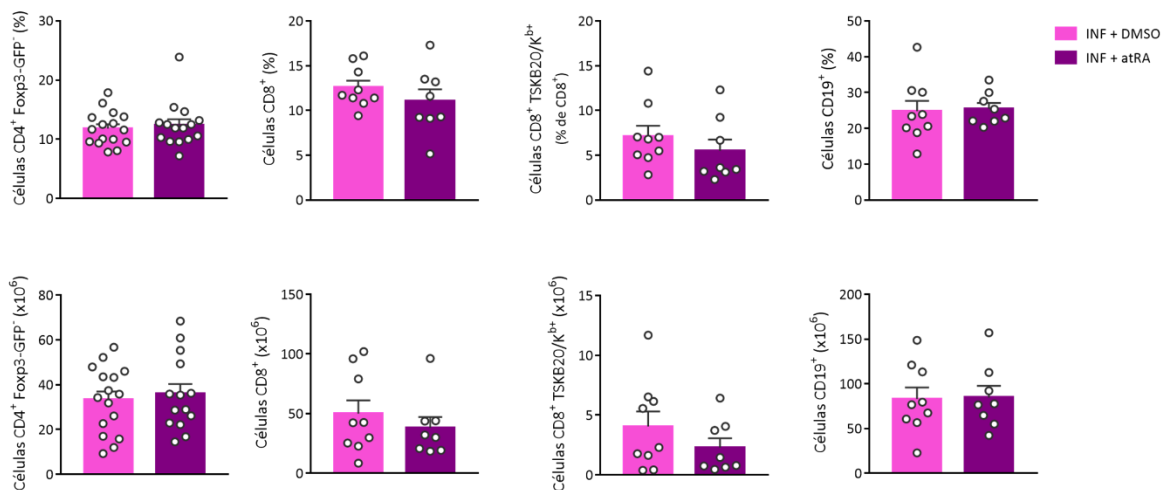
## Resultados II



**Figura 33: El tratamiento con atRA reduce los niveles de parásitos en sangre de ratones infectados con *T. cruzi*.**

Gráficos que muestran los niveles de parásitos y marcadores bioquímicos de daño en sangre de ratones Foxp3-GFP infectados tratados con atRA o DMSO de acuerdo al esquema en la figura 31A). Los datos son presentados como promedio + EEM, contando con un *n* de 3 a 16 animales correspondientes a 3 experimentos independientes para la parasitemia y 2 para las enzimas. Los valores *p* fueron calculados mediante t-test no apareado.

y específicos para *T. cruzi*, y células B (CD19<sup>+</sup>) en comparación con los grupos controles (figura 34). Se prosiguió entonces a evaluar el efecto del ácido retinoico sobre los niveles de citoquinas efectoras durante la infección. En este sentido, se observó que la administración con atRA incrementa la concentración plasmática de IFN- $\gamma$  pero no la de IL-17A con respecto de los animales tratados con DMSO (figura 35A). Luego, se determinaron los números de células productoras de ambas citoquinas mediante citometría de flujo en el bazo de estos ratones. A nivel local en órganos linfáticos



**Figura 34: El tratamiento con atRA no modifica los números de linfocitos efectoras durante la infección con *T. cruzi*.**

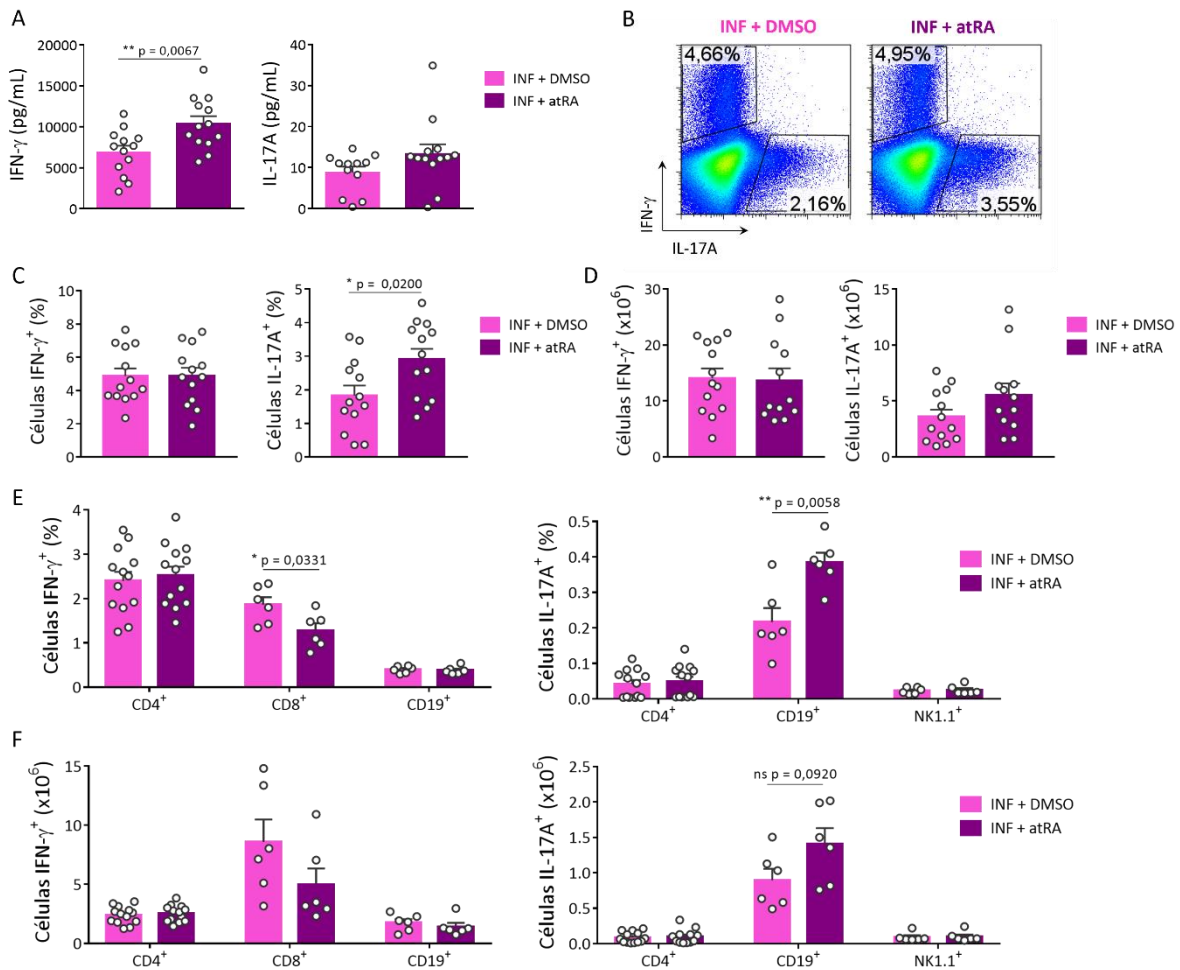
Gráficos que muestran la frecuencia (arriba) y los números absolutos (abajo) de diferentes poblaciones linfocitarias en bazo de ratones Foxp3-GFP infectados que fueron tratados con DMSO o atRA de acuerdo al esquema en la figura 31A). Los datos son presentados como promedio + EEM, contando con un *n* de 1 a 16 animales por grupo que corresponden de 2 a 3 experimentos independientes. Los valores *p* fueron calculados mediante t-test no apareado, resultando no significativos en todos los casos.



secundarios, la administración de atRA no alteró el porcentaje ni los números absolutos de esplenocitos productores de IFN- $\gamma$ , mientras que incrementó el porcentaje, pero no así los números absolutos, de leucocitos de bazo productores de IL-17A con respecto a los controles (figuras 35 B-D). Por último, se evaluaron mediante citometría de flujo los tipos celulares que producen ambas citoquinas en bazo de ratones infectados luego del tratamiento con ácido retinoico. Como se observa en las figuras 35 E-F, el tratamiento con atRA disminuye los números de linfocitos CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  en bazo (reducción significativa para la frecuencia mientras que se observa una tendencia en los números absolutos). Sin embargo este tratamiento no afectó los números de leucocitos de bazo CD4<sup>+</sup> y B (CD19<sup>+</sup>) productores de esta citoquina. Con respecto a IL-17A, la administración de atRA incrementa significativamente la frecuencia de linfocitos B que la producen (se observa una tendencia en los números absolutos), mientras que no altera los números de células CD4<sup>+</sup> y NK (NK1.1<sup>+</sup>) productores de IL-17A en bazo con respecto a los controles.

En resumen, estos resultados indican que en nuestras condiciones experimentales, la administración de ácido retinoico *in vivo* no promueve el desarrollo de células Treg en ratones controles no infectados ni en aquellos infectados con *T. cruzi*, así como tampoco modifica el estado de activación de las células Treg presentes en la infección. Por otro lado, los datos sugieren que el tratamiento con ácido retinoico favorece la producción sistémica de IFN- $\gamma$ , mientras que reduce los números de linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de esta citoquina en bazo. Asimismo, la administración de este metabolito incrementa los números de linfocitos B productores de IL-17A en bazo, lo cual, de acuerdo a resultados publicados por nuestro laboratorio [159], permitiría el control de la replicación parasitaria en animales infectados.

## Resultados II



**Figura 35:** El tratamiento con atRA estimula la producción de IFN- $\gamma$  e IL-17A durante la infección con *T. cruzi*.

Ratones Foxp3-GFP infectados fueron tratados con DMSO o atRA de acuerdo al esquema en la figura 31A). **A)** Concentración de IFN- $\gamma$  e IL-17A en el plasma sanguíneo de estos ratones cuantificadas por ELISA. **B-D)** Gráficos de citometría de flujo representativos (B) y gráficos de barras que muestran el porcentaje (C) y los números absolutos (D) de leucocitos de bazo que producen IFN- $\gamma$  o IL-17A luego del tratamiento. **E-F)** Gráficos que muestran el porcentaje (E) y los números absolutos (F) de poblaciones leucocitarias productoras de IFN- $\gamma$  o IL-17A en bazo de animales tratados con DMSO o atRA. Los datos son presentados como promedio + EEM de un  $n$  de 6 a 13 animales, y fueron obtenidos en 2 experimentos independientes para A-D) y para células CD4 $^+$  en E), y a un único experimento para el resto de las poblaciones celulares en E). Los valores  $p$  fueron calculados mediante t-test no apareado.

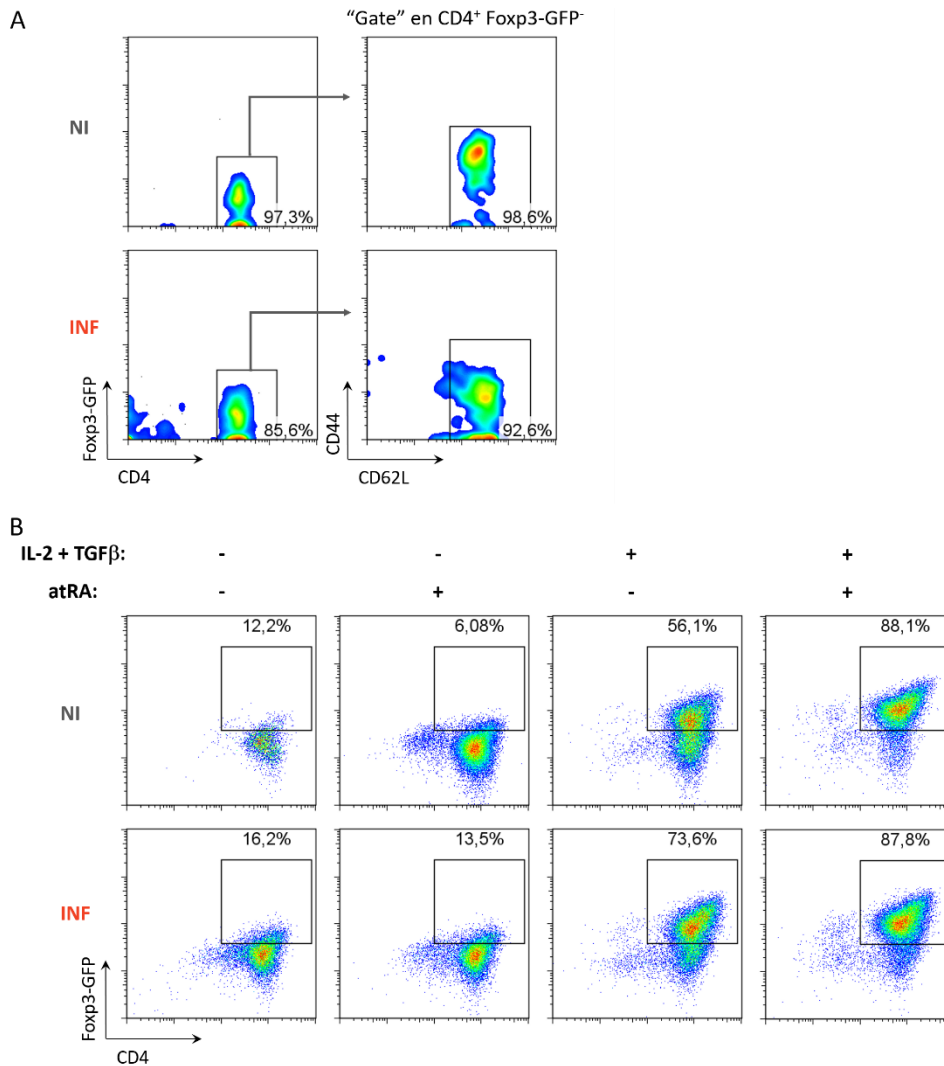
## Impacto del incremento en los números de células Treg durante la infección con *T. cruzi* por transferencia adoptiva de células iTreg

Considerando las limitaciones del tratamiento *in vivo* con ácido retinoico para estimular el desarrollo de células Treg en nuestro modelo, la siguiente estrategia adoptada a fin de incrementar los números de células Treg en animales infectados con *T.*

*cruzi* consistió en la transferencia adoptiva de células Treg diferenciadas *in vitro* (iTreg). La administración de células Treg es una estrategia de inmunointervención de desarrollo reciente, de intenso estudio frente a patologías como enfermedades autoinmunes y trasplantes, y que presenta ventajas con respecto a las estrategias actuales que involucran el uso de farmacoterapia inmunosupresora [205]. En este sentido, a continuación se detalla la puesta a punto del proceso de diferenciación de estas células, y el efecto que su administración genera sobre el desarrollo de la respuesta efectora y la progresión de la infección con *T. cruzi*.

#### *Diferenciación in vitro de células iTreg*

A partir de las condiciones experimentales determinadas anteriormente (figura 30), y con el objetivo de incrementar la pureza de la población diferenciada, se puso a punto un protocolo de diferenciación *in vitro* de células Treg a partir de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes. Para ello, células T CD4<sup>+</sup> vírgenes se purificaron mediante “cell sorting” como CD4<sup>+</sup> Foxp3-GFP<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup> de bazo de ratones Foxp3-GFP no infectados o al d14pi (figura 36A). La diferenciación con células de animales no infectados se llevó a cabo a fin de estudiar las células iTreg generadas y determinar si pueden ser utilizadas en experimentos de transferencias adoptivas, mientras que la inducción a partir de células purificadas de animales infectados se estudió con el objetivo de evaluar si las células de estos animales están condicionadas por el contexto inflamatorio de la infección para prevenir la generación de células Treg. Como se describió anteriormente, las células se cultivaron en presencia del estímulo policlonal (anti-CD3) y el co-estímulo (anti-CD28), adicionando o no medio condicionado con las citoquinas IL-2 y TGF- $\beta$  o alternativamente atRA. Luego de cuatro días de cultivo en estas condiciones, se analizó mediante citometría de flujo el porcentaje de células que se diferenciaron a iTreg. Como se observa en la figura 36B, la diferenciación a iTreg solo se produjo en las condiciones con citoquinas presentes en el medio, siendo potenciado el efecto por la presencia de atRA. De manera interesante, la diferenciación de células Treg ocurrió en magnitud similar más allá del contexto inflamatorio (no infección versus infección con *T. cruzi*) del cual fueron obtenidas las células vírgenes.



**Figura 36: Diferenciación *in vitro* de células iTreg.**

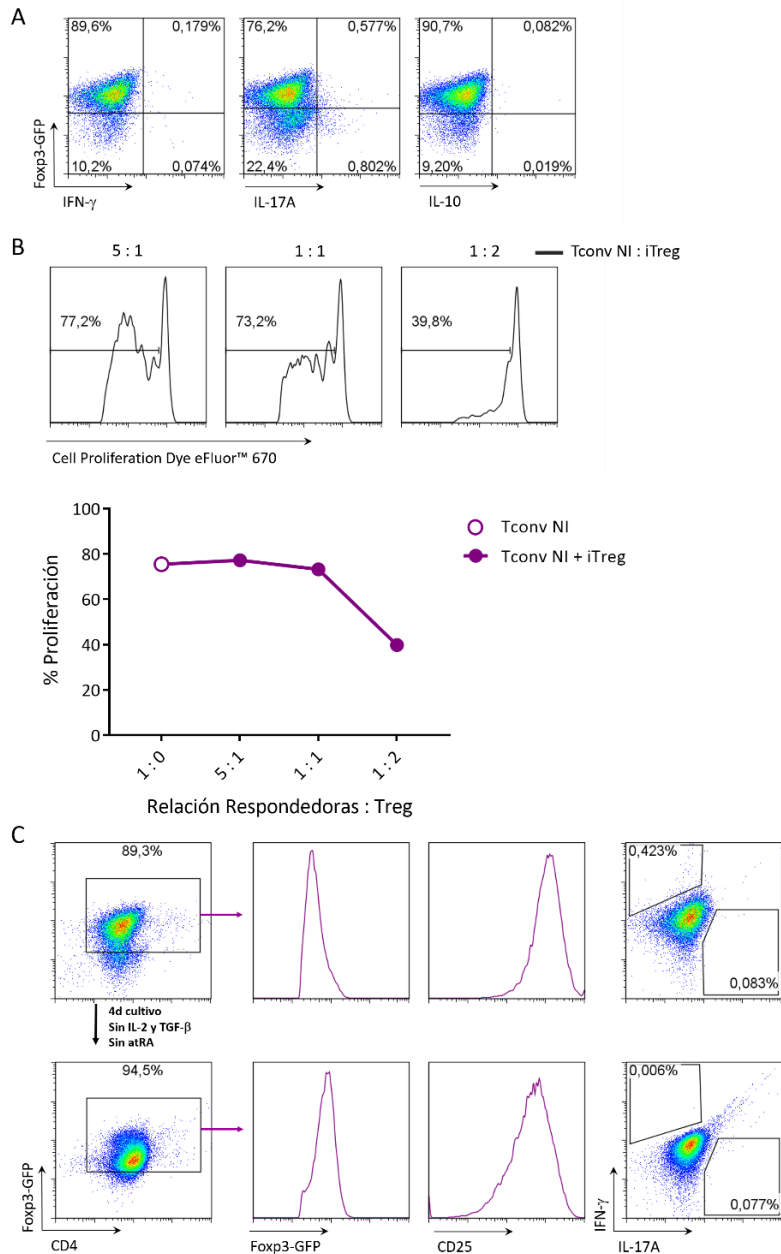
Se purificaron células T CD4<sup>+</sup> vírgenes (CD4<sup>+</sup> Foxp3-GFP<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup>) del bazo de ratones Foxp3-GFP no infectados o al d14pi y se cultivaron durante cuatro días en presencia de anti-CD3 y anti-CD28, adicionando al medio de cultivo IL-2, TGF-β y atRA (13,3 nM) según corresponda. **A)** Gráficos de citometría de flujo representativos del control de pureza posterior a la purificación por "cell sorting". La purificación se realizó a partir de un conjunto de 3 (NI) ó 4 (INF) animales. **B)** Gráficos de citometría de flujo que muestran el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes que se diferenció a iTreg (CD4<sup>+</sup> Foxp3-GFP<sup>+</sup>) en el cuarto día de cultivo. Los gráficos son representativos de los triplicados técnicos realizados para cada condición.

Finalmente, teniendo en cuenta que las células iTreg diferenciadas a partir de células obtenidas de animales no infectados se utilizarían para ensayos de transferencia adoptiva, se estudió la función efectora y la estabilidad de las células iTreg. Esta evaluación es relevante dado que se ha reportado que las células iTreg diferenciadas *in vitro* en presencia de TGF-β reducen marcadamente la expresión de Foxp3 si son re-estimuladas *in vitro* en ausencia de esta citoquina [206] o al ser transferidas a animales [207, 208], perdiendo su capacidad supresora [208].

Para evaluar esto, células T CD4<sup>+</sup> vírgenes purificadas de bazo de ratones no infectados se cultivaron en las condiciones inductoras de células Treg en presencia de IL-2, TGF- $\beta$  y atRA durante cuatro días. En este momento, se evaluó si las células iTreg generadas conservaban la capacidad de producir cierto grado de citoquinas inflamatorias, como ha sido sugerido para células T CD4<sup>+</sup> vírgenes activadas [209], y si eran productoras de IL-10. El análisis por citometría de flujo reveló que las células iTreg diferenciadas no producen IFN- $\gamma$ , IL-17A ni IL-10, como así tampoco lo hace la pequeña fracción de células que no indujo la expresión de Foxp3 (figura 37A). En segunda instancia, se evaluó la funcionalidad de las células iTreg mediante un ensayo de supresión de la proliferación *in vitro*. Para ello, las células Foxp3-GFP<sup>+</sup> generadas *in vitro* se purificaron mediante “cell sorting” y se cultivaron en distintas relaciones con células Tconv respondedoras obtenidas de animales Foxp3-GFP no infectados y teñidas con Cell Proliferation Dye eFluor™ 670. Al igual que en los ensayos de supresión *in vitro* de la sección anterior, luego de cuatro días de cultivo se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de células respondedoras que proliferaron. En la figura 37B, se observa que las células iTreg fueron capaces de inhibir la proliferación de las Tconv, al menos en la relación con mayor proporción de células iTreg. A continuación, para el estudio de la estabilidad, se determinó mediante citometría de flujo el nivel de expresión de Foxp3 y CD25, así como la producción de IFN- $\gamma$  e IL-17A por parte de las células iTreg diferenciadas, y luego de su re-purificación y cultivo adicional por cuatro días en ausencia del medio condicionado. Como se observa en la figura 37C, las células iTreg generadas continúan expresando Foxp3 y CD25 al cabo de cuatro días en cultivo sin las condiciones polarizantes. Además, las células iTreg no producen las citoquinas pro-inflamatorias, tanto previa como posteriormente al cambio en las condiciones de cultivo.

En resumen, estos resultados muestran que las células iTreg diferenciadas *in vitro* en nuestro sistema mediante IL-2, TGF- $\beta$  y atRA, corresponden a una población regulatoria estable que no pierde la expresión de Foxp3 y CD25, ni produce citoquinas pro-inflamatorias, y tiene capacidad supresora en ausencia del estímulo polarizante.

## Resultados II

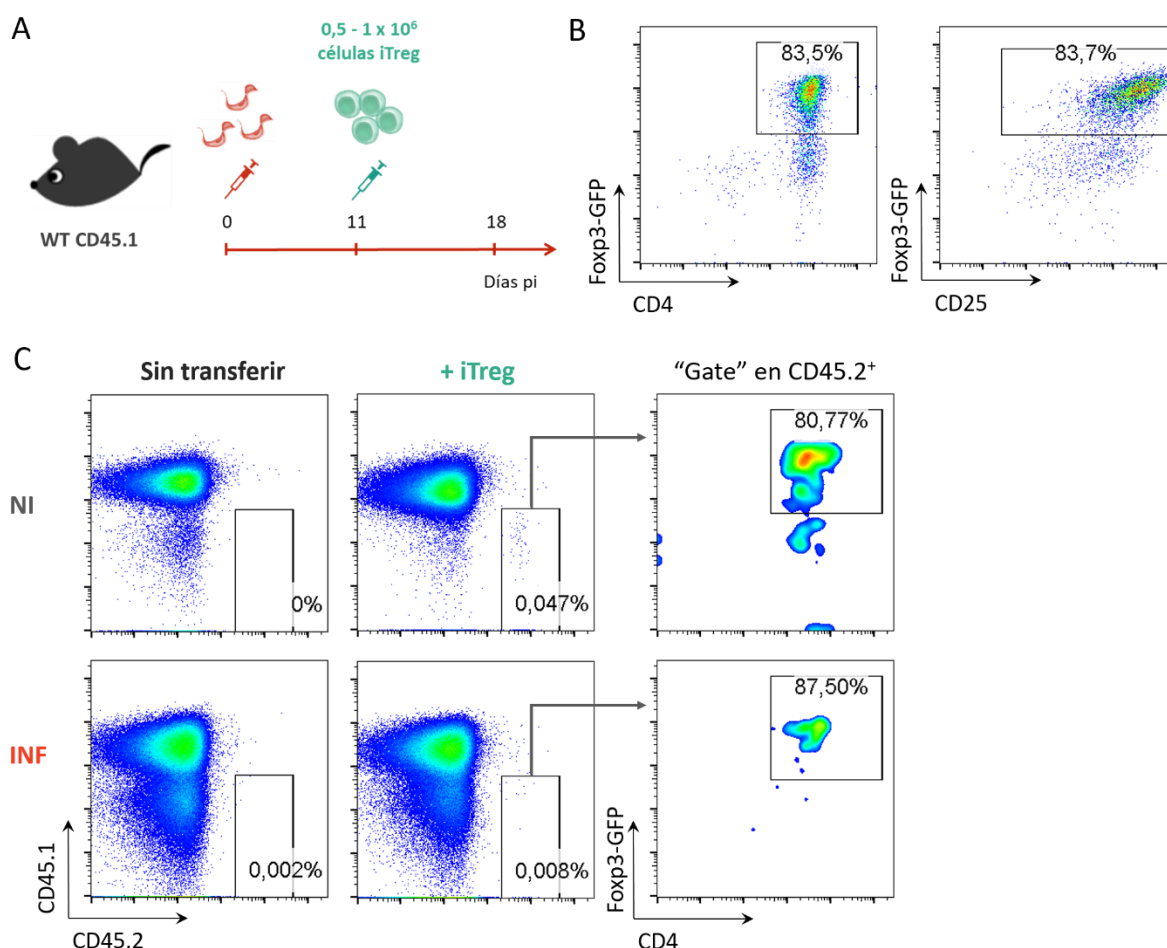


**Figura 37: Las células iTreg diferenciadas *in vitro* son estables y tienen capacidad supresora.**

Se diferenciaron células iTreg a partir de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes (CD4<sup>+</sup> Fopx3-GFP<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup>) purificadas de bazo de ratones Fopx3-GFP no infectados en presencia de medio condicionado con IL-2, TGF- $\beta$  y atRA (13,3 nM). Al cuarto día de cultivo se determinó el nivel de expresión de marcadores de células Treg y la producción de citoquinas. Las células Fopx3-GFP<sup>+</sup> restantes se purificaron y se utilizaron para un ensayo de supresión de la proliferación *in vitro* o se cultivaron en presencia de anti-CD3 y anti-CD28 pero sin medio condicionado. Luego de cuatro días adicionales de cultivo se repitieron las determinaciones previas. **A)** Gráficos de citometría de flujo de la tinción intracelular con IFN- $\gamma$ , IL-17A o IL-10 luego de 4 días de cultivo en medio condicionado. **B)** Ensayo de supresión de la proliferación *in vitro*. Células Tconv (CD4<sup>+</sup> Fopx3-GFP<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>) se purificaron de bazo de ratones Fopx3-GFP NI, se marcaron con el colorante Cell Proliferation Dye eFluor™ 670 y se co-cultivaron en diferentes relaciones con células iTreg purificadas en presencia de anti-CD3 y anti-CD28. Luego de cuatro días, se analizó mediante citometría de flujo la dilución del colorante en las células respondedoras Tconv. Se muestran gráficos de citometría de flujo indicando el porcentaje de células respondedoras que proliferaron y el gráfico de barras correspondiente. **C)** Gráficos de citometría de flujo de la expresión de Fopx3 y CD25, y de la producción de IFN- $\gamma$  e IL-17A por las células iTreg, inmediatamente luego de la diferenciación o pasados cuatro días adicionales de cultivo. Para purificar cada población celular se partió de un conjunto de 2 ó 3 animales.

### Transferencia adoptiva de células iTreg durante la infección con *T. cruzi*

Una vez puestas a punto las condiciones para la diferenciación *in vitro* de células iTreg, y habiendo determinado que las mismas son estables y ejercen actividad supresora *in vitro*, se prosiguió a transferirlas adoptivamente con el fin de incrementar los números de células Treg en animales infectados con *T. cruzi* y evaluar el efecto que esto conlleva sobre la progresión de la infección y la respuesta inmune efectora. Para ello, ratones WT CD45.1 se infectaron con la dosis habitual de tripomastigotes y luego de 11 días fueron transferidos con 0,5 a 1 millón de células iTreg mediante inyección endovenosa (figuras 38A y B). Como control, se utilizaron ratones infectados que no recibieron la transferencia de estas células, además de animales no infectados que fueron o no transferidos. Al igual



**Figura 38: La células iTreg son estables luego de la transferencia a animales infectados con *T. cruzi*.**

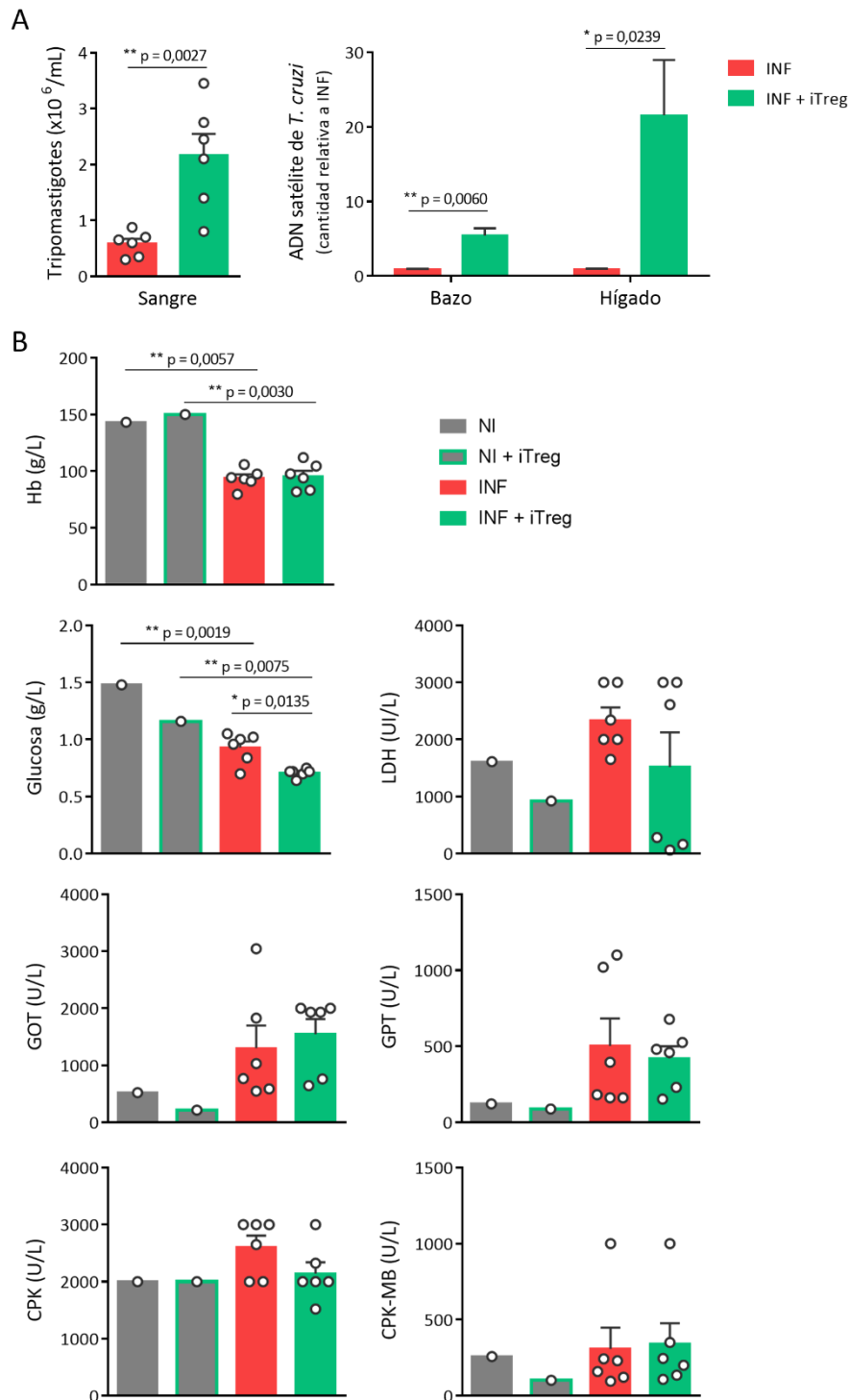
**A)** Ratones WT CD45.1 fueron o no infectados y al d11pi transferidos en forma intravenosa con 0,5 a 1 x 10<sup>6</sup> células iTreg diferenciadas *in vitro* a partir de células Tconv (CD4<sup>+</sup> Foxp3-GFP<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>) de bazo de ratones Foxp3-GFP CD45.2 no infectados. Los animales fueron sacrificados al d17-18pi. **B)** Gráficos de citometría de flujo para el porcentaje de células iTreg obtenido luego de la diferenciación *in vitro* durante cuatro de días de cultivo en presencia de IL-2, TGF-β y atRA, previo a la transferencia adoptiva. **C)** Gráficos de citometría de flujo representativos para el porcentaje de células transferidas (CD45.2<sup>+</sup>) y su proporción de células Treg (CD4<sup>+</sup> Foxp3-GFP<sup>+</sup>) en el bazo de ratones WT CD45.1 luego de 17 días pi, o en controles no infectados.

que para los tratamientos *in vivo* con atRA de la sección anterior, la transferencia se realizó en este día pi, dado que corresponde al momento en que comienza a reducirse la frecuencia de células Treg endógenas durante la infección aguda (figura 6). Por otro lado, se utilizaron como animales receptores ratones que expresan el marcador congénico CD45.1, de forma tal de distinguir las células transferidas (CD45.2<sup>+</sup>) de las células endógenas del animal receptor (CD45.1<sup>+</sup>). Teniendo en cuenta que la transferencia de células iTreg pareció comprometer la supervivencia de los animales infectados, el efecto en la administración de estas células se evaluó a los días 17-18 pi y no en tiempos posteriores.

En primer lugar se verificó la estabilidad de las células iTreg una vez transferidas, al momento en que los animales fueron sacrificados seis a siete días luego de la inyección. Para ello, se determinó mediante citometría de flujo la presencia de células CD45.2<sup>+</sup> en diferentes órganos. Sin embargo, dado el pequeño número de células inyectadas y su distribución en el organismo, estas células fueron difíciles de rastrear y solo pudieron detectarse en el bazo de algunos de los animales transferidos. En este sentido, las células CD45.2<sup>+</sup> que se detectaron tanto en hospedadores normales como infectados conservaron la misma proporción de células iTreg (CD4<sup>+</sup> Foxp3-GFP<sup>+</sup>) que antes de la transferencia (figuras 38B y C).

A continuación se estudió el efecto del incremento en los números de células Treg sobre la progresión de la infección. Para ello, se cuantificaron los niveles de parásitos en sangre y en tejidos, como así también los niveles plasmáticos de glucosa, hemoglobina y marcadores bioquímicos de daño tisular. Como se muestra en la figura 39, los animales infectados que recibieron células iTreg exhibieron niveles marcadamente incrementados de parásitos respecto de los no tratados, tanto en circulación sanguínea como en bazo e hígado. Además, estos animales presentaron disminuido su nivel de glucosa en plasma, si bien el resto de los marcadores bioquímicos no se vieron afectados al d17-18pi. Estos resultados sugirieron que el aumento en los números de células Treg en los animales infectados transferidos tuvo como consecuencia defectos en el control de la replicación parasitaria, por lo que a continuación se prosiguió a evaluar la respuesta inmune efectora en ratones infectados. Como primera medida, se determinaron los números de leucocitos en diferentes órganos linfoides secundarios, como así también en timo y en el infiltrado hepático. La transferencia de células iTreg provocó una disminución en el número de leucocitos de bazo e hígado, sin afectar el recuento celular de ganglios inguinales,





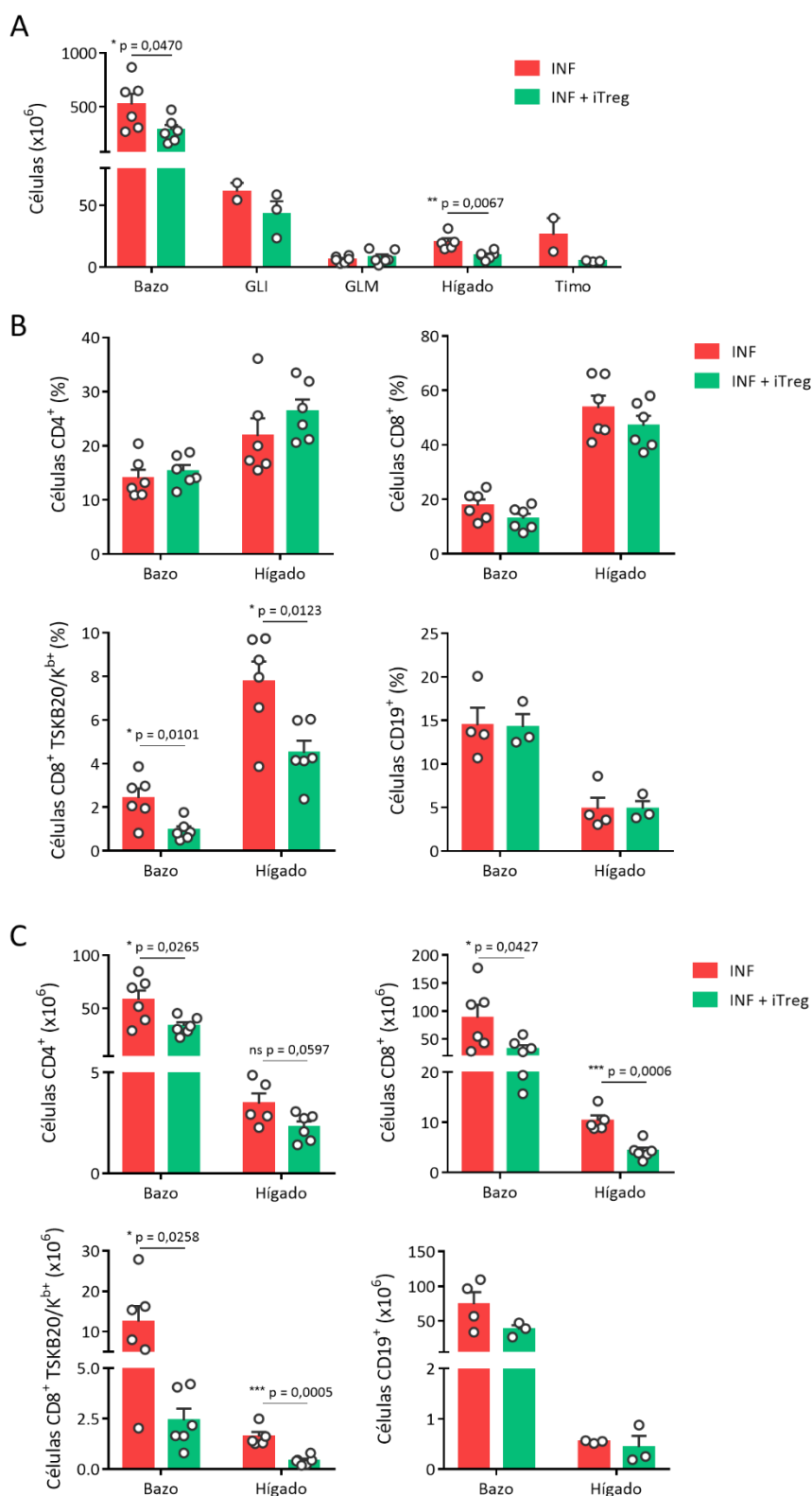
**Figura 39: La transferencia adoptiva de células iTreg afecta el control de la replicación parasitaria en la infección aguda con *T. cruzi*.**

**A)** Niveles de parásito en sangre tras el recuento al microscopio (izquierda), y en bazo e hígado cuantificado mediante PCR en tiempo real (derecha) de animales WT CD45.1 que fueron o no transferidos con iTreg de acuerdo al esquema en la figura 38A. **B)** Concentración de hemoglobina (Hb), de glucosa en plasma sanguíneo, y nivel de actividad de las enzimas LDH, GOT, GPT, CPK y CPK-MB en plasma sanguíneo de estos mismos ratones. Los datos fueron obtenidos en dos experimentos independientes y son presentados como promedio + EEM. En el caso del parasitismo tisular los datos corresponden a duplicados y triplicados técnicos provenientes de un conjunto de 3 ó 4 animales para cada experimento independiente. Los valores p fueron calculados mediante t-test no apareado y ANOVA de una vía con posterior comparación múltiple de Tukey, según corresponda.

mesentéricos o timo (figura 40A). Con el objetivo de determinar si estas variaciones en los números fueron debidas a cambios de alguna población celular específica, se prosiguió a focalizar el análisis sobre los números de diferentes tipos de linfocitos. Como se observa en la figuras 40C, la transferencia de células iTreg genera una reducción en los números absolutos de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> totales y CD8<sup>+</sup> específicos (TSKB20/K<sup>b+</sup>) para *T. cruzi*, pero no de células B (CD19<sup>+</sup>) en bazo e infiltrado hepático al d17-18pi respecto de los controles sin transferir. Estos cambios se vieron reflejados también en la frecuencia de células CD8<sup>+</sup> parásito-específicas pero no en la frecuencia de las otras poblaciones (figura 40B).

Con el fin de profundizar en el análisis del efecto del incremento en los números de células Treg sobre la respuesta inmune efectora de animales infectados, se estudió la concentración de citoquinas en plasma sanguíneo, así como los números de células capaces de producir citoquinas efectoras al d17-18pi en bazo e hígado. No se observaron diferencias en la cuantificación de IFN- $\gamma$  e IL-17A en plasma, como así tampoco en los porcentajes y números absolutos de células productoras de IFN- $\gamma$ , IL-17A y TNF (figura 41) en bazo e infiltrado hepático entre los ratones de ambos grupos.

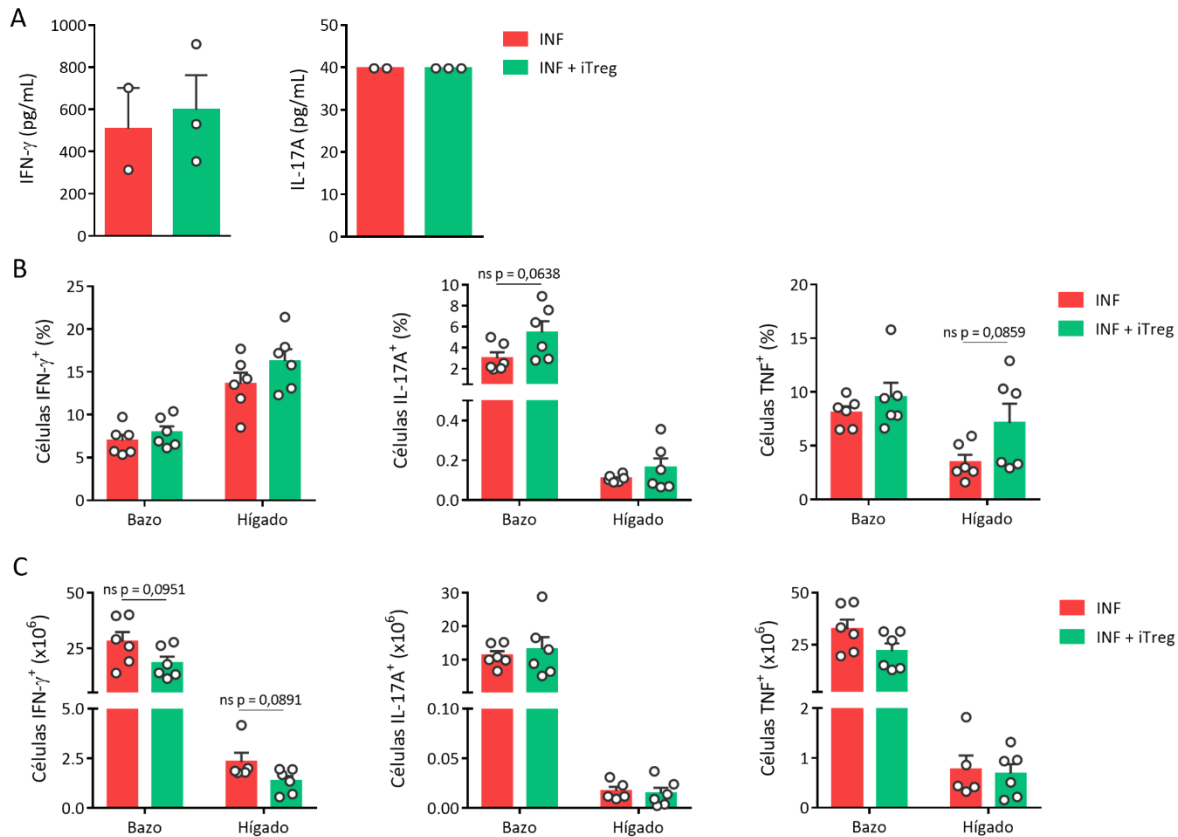
En conjunto, estos resultados sugieren que las células Treg pueden ejercer una regulación importante sobre la inmunidad anti-parasitaria. Esta regulación no ocurre a través de cambios en la secreción de citoquinas efectoras ni el número de linfocitos B, sino en la respuesta celular efectora que incluye linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para el parásito y, probablemente, células T efectoras CD4<sup>+</sup>.



**Figura 40: La transferencia adoptiva de células iTreg impacta sobre los números de linfocitos T efectoros durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*.**

**A)** Recuento leucocitario en diferentes órganos al d17-18pi en animales WT CD45.1 que habían sido o no previamente transferidos con células iTreg de acuerdo al esquema en la figura 38A. **B-C)** Frecuencia (B) y números absolutos (C) de diferentes poblaciones de linfocitos efectoros en bazo e infiltrado hepático en los mismos ratones. Los datos fueron obtenidos en dos experimentos independientes y son presentados como promedio + EEM. En el caso de GLI, timo y células CD19<sup>+</sup> los datos corresponden a un único experimento. Los valores p fueron calculados mediante t-test no apareado.

## Resultados II



**Figura 41: La transferencia adoptiva de células iTreg no modifica la producción de citoquinas efectoras durante la infección con *T. cruzi*.**

**A)** Concentración de IFN- $\gamma$  e IL-17A al d17-18pi en el plasma sanguíneo de ratones WT CD45.1 que habían sido o no previamente transferidos con células iTReg de acuerdo al esquema en la figura 38A.

**B-C)** Frecuencia (B) y números absolutos (C) de células productoras de IFN- $\gamma$ , IL-17A y TNF en bazo e infiltrado leucocitario hepático en los mismos ratones. Los datos son presentados como promedio + EEM, y corresponden a un experimento en A) y a dos experimentos independientes en B) y C). Los valores p fueron calculados mediante t-test no apareado.

## Efecto de la disminución en los números de células Treg luego de la eliminación específica durante la infección con *T. cruzi*

Con el objetivo de profundizar en el análisis sobre la función de las células Treg durante la infección con *T. cruzi*, se continuó evaluando el efecto de la modificación en los números de estas células. En esta segunda etapa, se procedió a disminuir los números de células Treg endógenas de animales infectados y determinar el impacto que esto produce sobre la progresión de la infección y el desarrollo de la respuesta efectora anti-parasitaria. Para ello, se utilizaron ratones DREG, animales modificados genéticamente que poseen un transgén que codifica para una proteína de fusión entre el receptor de la toxina

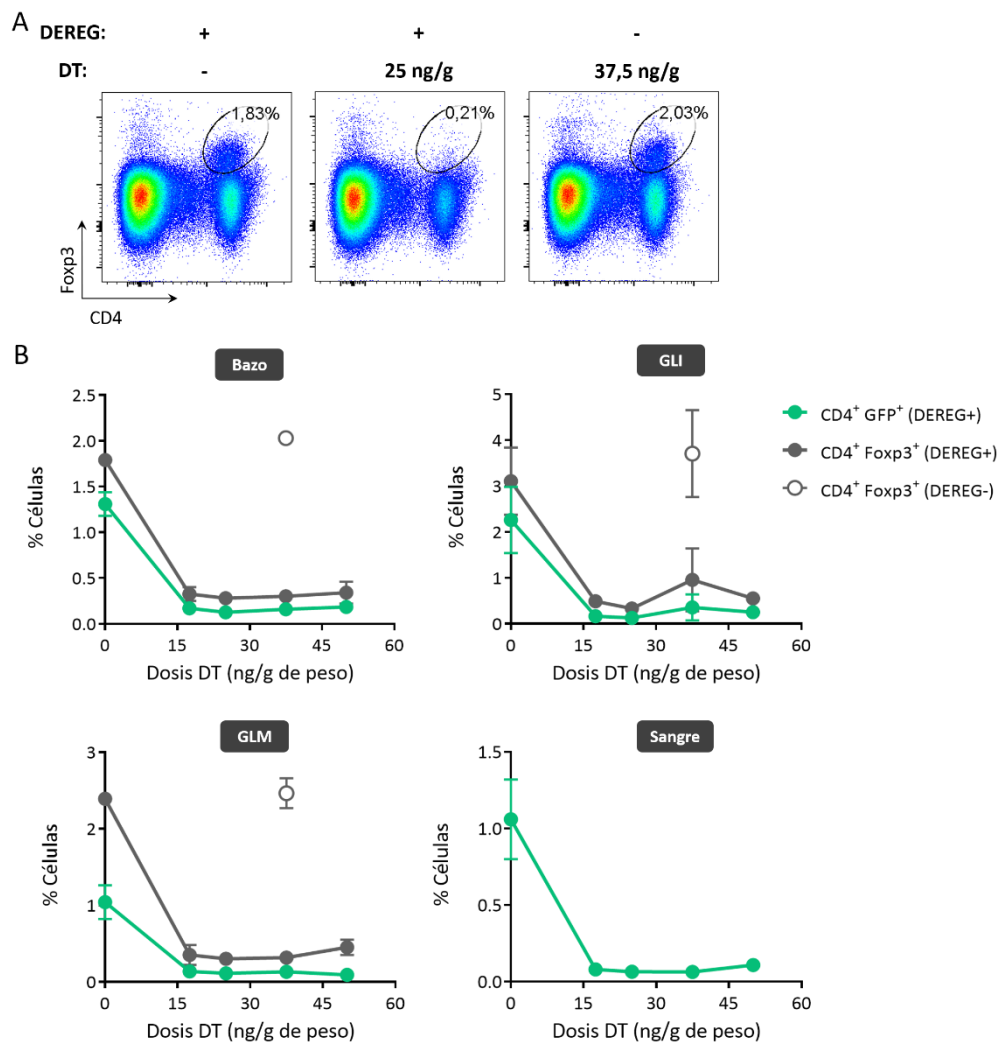
diftérica de primates y la proteína fluorescente verde (DTR-eGFP). Considerando que los ratones son  $10^3$  a  $10^5$  veces menos susceptibles a la acción de la toxina diftérica (DT) que los primates, y dado que este transgén se encuentra bajo el control de un promotor de Foxp3 adicional, la administración de esta toxina a animales DREG permite la eliminación específica de las células Treg en el momento deseado durante el curso de una respuesta inmune [210, 211]. Esta eliminación ocurre como consecuencia de una muerte celular rápida por apoptosis desencadenada por el bloqueo en la síntesis proteica que genera la toxina diftérica. Por otro lado, la co-expresión de DTR y GFP permite el monitoreo mediante citometría de flujo de las células Treg (DTR-GFP<sup>+</sup> y en consecuencia Foxp3<sup>+</sup>), lo cual permite conocer la eficacia de la eliminación. No obstante, se ha reportado la posibilidad de una eliminación incompleta de células Treg en este modelo, mientras que la eliminación por tiempos prolongados, mayores a dos semanas, no es factible debido a la selección de una pequeña población inicial de células Treg Foxp3<sup>+</sup> que no expresan el transgén (GFP<sup>-</sup>) [211].

Con el objetivo de llevar a cabo la eliminación de células Treg durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*, en primer lugar se puso a punto la dosis de toxina diftérica a inyectar en ratones DREG, y en una segunda instancia se llevaron a cabo los experimentos de eliminación propiamente dichos. Ambos procedimientos y sus resultados se detallan a continuación.

#### *Determinación de la dosis de toxina diftérica a utilizar en la eliminación específica de células Treg*

Considerando que altos niveles de DT pueden tener un efecto nocivo sobre los ratones, se estableció la dosis óptima de DT con la que se obtiene una eliminación eficiente de células Treg en animales DREG no infectados. Para ello, estos ratones se inyectaron en forma intraperitoneal por dos días consecutivos con diferentes dosis de DT, y al día siguiente de la última inyección, se evaluó el grado de eliminación de células Treg en bazo, ganglios y sangre. Además, para evaluar la posible toxicidad de la DT, se administró una dosis intermedia de DT a ratones “littermates” (hermanos de camada) que no poseen el transgén (GFP<sup>-</sup>) y que están por lo tanto exentos a sufrir eliminación de células Treg en este modelo. A partir de ahora, los animales “littermates” serán llamados ratones DREG-, mientras que aquellos animales que sí poseen el transgén se

denominarán DERE<sup>G+</sup>. El grado de eliminación luego del tratamiento se determinó por citometría de flujo evaluando el porcentaje de células Treg en los diferentes órganos de animales tratados identificadas por la expresión de GFP en células T CD4<sup>+</sup>, o alternativamente la expresión intracelular de Foxp3. Como se observa en la figura 42, las cuatro dosis probadas de DT indujeron una eliminación eficiente de células Treg, dada por la disminución en el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> en animales DERE<sup>G+</sup>. La frecuencia de estas células identificada por tinción de superficie fue similar a la de células CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> determinada por tinción intracelular de Foxp3 en todos los órganos estudiados, lo



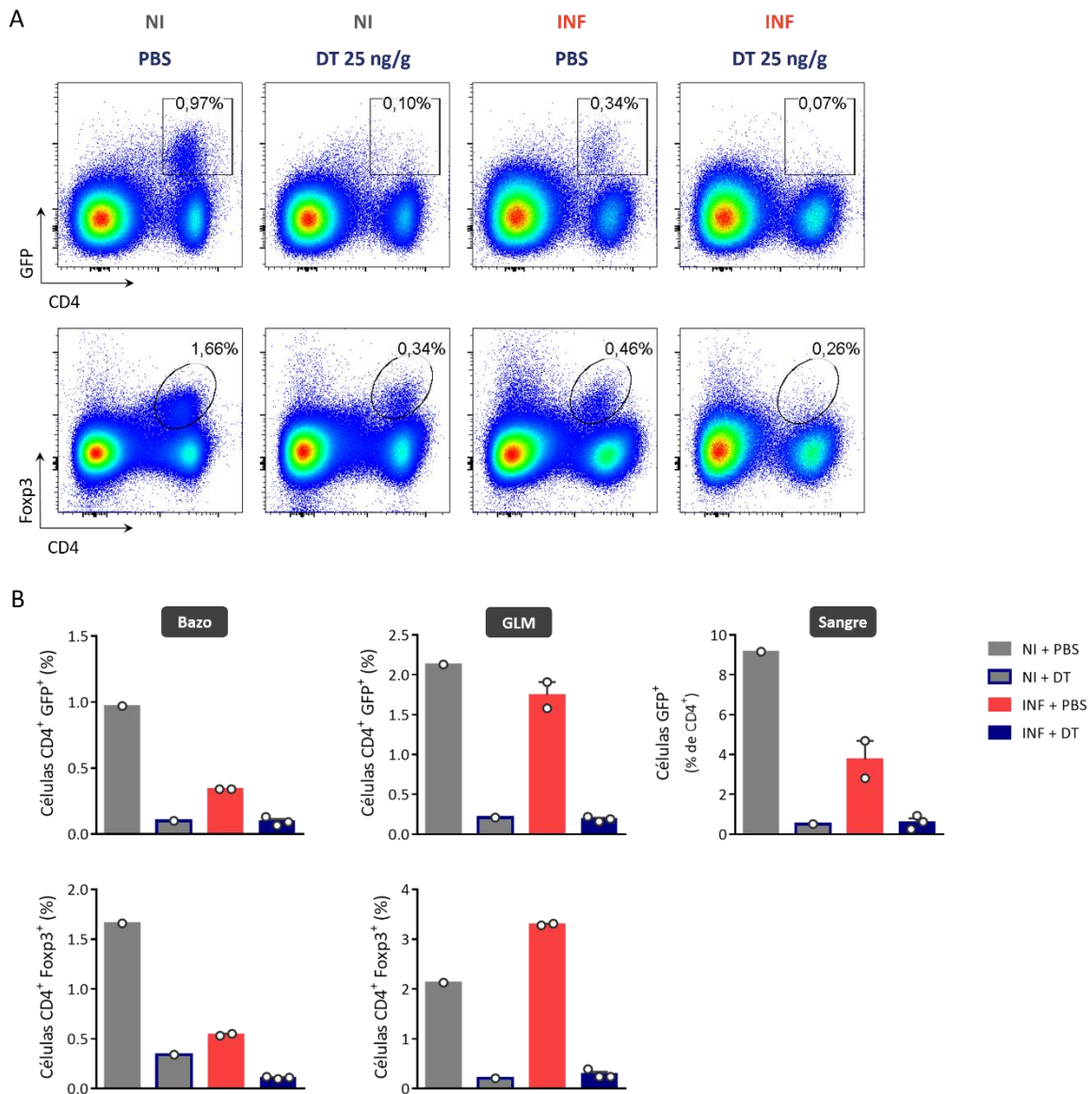
**Figura 42: Puesta a punto de la dosis de DT a utilizar en experimentos de eliminación de células Treg.**

Ratones DERE<sup>G+</sup>, o "littermates" DERE<sup>G-</sup>, fueron tratados con diferentes dosis de DT inyectada en forma intraperitoneal durante dos días consecutivos. El día posterior al último tratamiento, los animales se sacrificaron para evaluar la eficiencia de la eliminación en diferentes órganos. **A)** Gráficos de citometría de flujo representativos para el porcentaje de células Treg (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) en el bazo de animales DERE<sup>G+</sup> y DERE<sup>G-</sup> tratados con la dosis indicada de DT. **B)** Gráficos del porcentaje de células Treg en diferentes órganos luego de la tinción de superficie (líneas verdes) e intracelular (líneas grises completas) de ratones DERE<sup>G+</sup>, y en la tinción intracelular (círculo blanco) de ratones DERE<sup>G-</sup> inyectados con diferentes dosis de DT. Los datos están graficados como promedio ± EEM, y corresponden a dos animales por condición.

cual da cuenta de la eficacia de la eliminación. Además se verificó que los ratones DREG-, los cuales recibieron una dosis de 37,5 ng de DT por gramo de peso exhiben un porcentaje de células Treg (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) similar a los animales DREG+ que no recibieron DT. Considerando que en el rango de dosis de DT utilizadas se observó una eliminación eficiente de células Treg en ausencia de evidencias de toxicidad, se eligió la concentración intermedia de 25 ng/g como la óptima para la eliminación.

En tal sentido, una vez determinada la dosis de DT a utilizar, se prosiguió a evaluar la eficacia de la eliminación de células Treg en ratones infectados con *T. cruzi*. Para ello, animales DREG+ se infectaron con la dosis usual de tripomastigotes utilizada en este trabajo, y a los días 11 y 12 pi se les inyectó 25 ng/g de DT en forma intraperitoneal o PBS como control. Teniendo en cuenta que la infección produce ya una disminución en la frecuencia de células Treg, el tratamiento se administró también a animales no infectados a fin de verificar el funcionamiento de la DT. Por otro lado, ratones DREG- no infectados e infectados al mismo tiempo que los DREG+, fueron tratados con DT, con el objetivo de determinar si la administración de esta toxina puede afectar la sobrevivencia de ratones infectados con *T. cruzi* por mecanismos independiente a la eliminación de células Treg. La eficacia de la eliminación se evaluó igual que antes, mediante citometría de flujo con tinciones de superficie e intracelular para Foxp3 en bazo, GLM y sangre al d14pi. La figura 43 muestra que la administración de la dosis indicada de DT es también eficiente en la eliminación de células Treg de ratones DREG+ infectados, dado que todos los animales que recibieron el tratamiento con DT exhibieron una disminución en su frecuencia de células Treg en todos los órganos estudiados. Además, estos resultados indican que la eliminación puede monitorearse a través de la evaluación de células CD4<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> por citometría de flujo, ya que los números de células Treg determinados de esta forma fueron similares a los de la tinción para Foxp3 intracelular. Por último, el tratamiento con DT de los ratones DREG- infectados no afectó la sobrevivencia de los mismos hasta el d14pi, indicando que la dosis utilizada de toxina no resulta deletérea en animales infectados con *T. cruzi*.

Estos experimentos permitieron determinar la dosis de DT a utilizar para una eliminación eficiente de células Treg, y la seguridad de su administración a animales que cursan con la infección por *T. cruzi*.



**Figura 43: La eliminación de células Treg por administración de DT es eficiente en animales infectados con *T. cruzi*.**

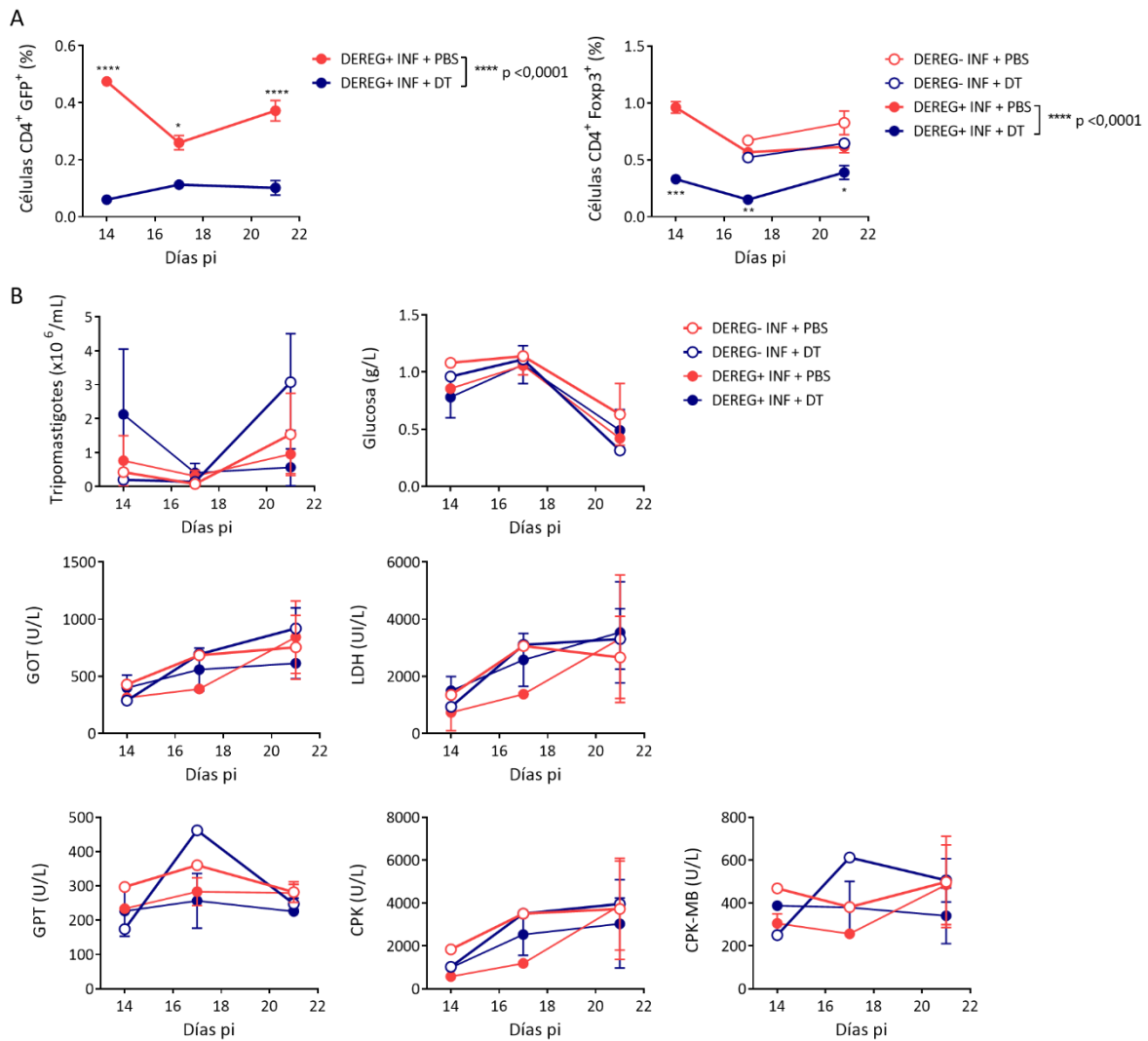
Ratones DERE<sup>g+</sup> se infectaron o no con *T. cruzi*. En los días 11 y 12 pi se inyectaron con 25 ng de DT por g de peso o con PBS en forma intraperitoneal. Al d14pi, los animales se sacrificaron para evaluar la eficiencia de la eliminación en diferentes órganos. **A)** Gráficos de citometría de flujo representativos para el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> en la tinción de superficie y CD4<sup>+</sup> Fopx3<sup>+</sup> en la tinción intracelular de bazo al d14pi. **B)** Gráficos que muestran el porcentaje de células Treg en diferentes órganos luego de la tinción de superficie (paneles superiores) e intracelular (paneles inferiores) al d14pi o en animales no infectados que fueron inyectados con PBS o DT. Los datos están graficados como promedio + EEM.

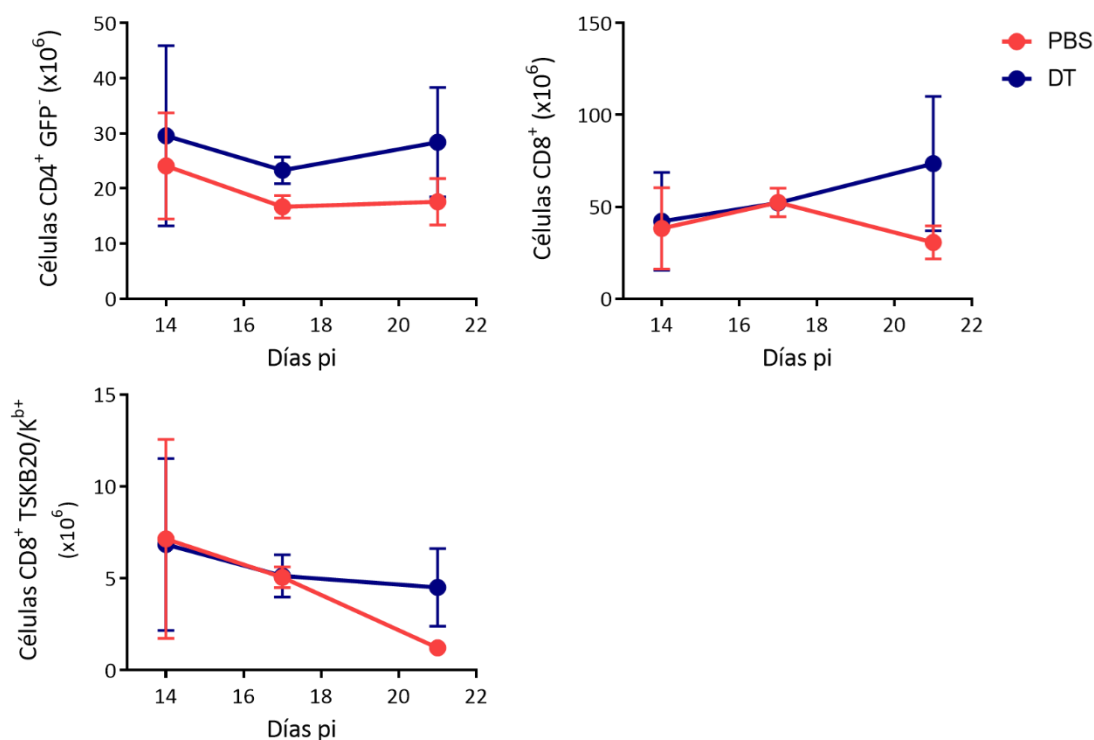


*Eliminación de células Treg durante la infección con T. cruzi*

Una vez determinadas las condiciones experimentales para la eliminación, se analizó el efecto de la disminución en los números de células Treg sobre la progresión de la infección con *T. cruzi* y la magnitud de la respuesta efectora anti-parasitaria. Para ello, ratones DREG+ infectados fueron inyectados con 25 ng/g de DT o con PBS como control a los días 11 y 12 pi. La inyección se realizó en este momento de la infección con el objetivo de profundizar la disminución en la frecuencia de células Treg que se inicia en este dpi (figura 6), y considerando además que el incremento en los números de células Treg mediante transferencia adoptiva en este dpi tuvo un efecto marcado en la infección, como se detalló en la sección anterior. También se trataron animales DREG- con el fin de determinar si la presencia en sí de DT podía alterar la progresión de la infección. La eficacia de la eliminación, así como su efecto sobre diferentes parámetros, fue evaluada a diferentes tiempos de la infección. Como se observa en la figura 44A, tanto los porcentajes de células CD4<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> como los de CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> disminuyen significativamente en bazo de los animales DREG+ tratados con DT, lo que indica que la administración de esta toxina en dos dosis consecutivas a los días 11 y 12 pi fue suficiente para una eliminación efectiva de células Treg, la cual se mantuvo hasta el d21pi inclusive. Por otro lado, como era de esperar, los ratones DREG- no responden al tratamiento, por lo que los números de células Treg en estos animales se mantienen a niveles similares a los de ratones DREG+ inyectados con PBS. Contrariamente a lo esperado, no se detectaron diferencias en los niveles de parasitemia, glucosa, y la actividad plasmática de diferentes enzimas marcadoras de daño tisular, entre los diferentes grupos de ratones en ninguno de los tiempos estudiados, indicando que tanto la eliminación de células Treg al día 11-12 pi, como la administración de DT, no alteran los niveles de parásitos, el estado de salud general y el daño tisular de animales infectados (figura 44B). En concordancia con esto, la eliminación de células Treg en estas condiciones experimentales tampoco tuvo un efecto significativo sobre los números absolutos de las poblaciones de células Tconv (CD4<sup>+</sup> GFP<sup>-</sup>) y de linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales y específicos para *T. cruzi* en el bazo (figura 45), como así tampoco en GLM y sangre (datos no mostrados) de animales DREG+ a los diferentes tiempos de infección estudiados. En conjunto, estos resultados sugieren que la eliminación de células Treg a partir del d11pi podría ser tardía para evidenciar un efecto en la progresión de la infección.

## Resultados II



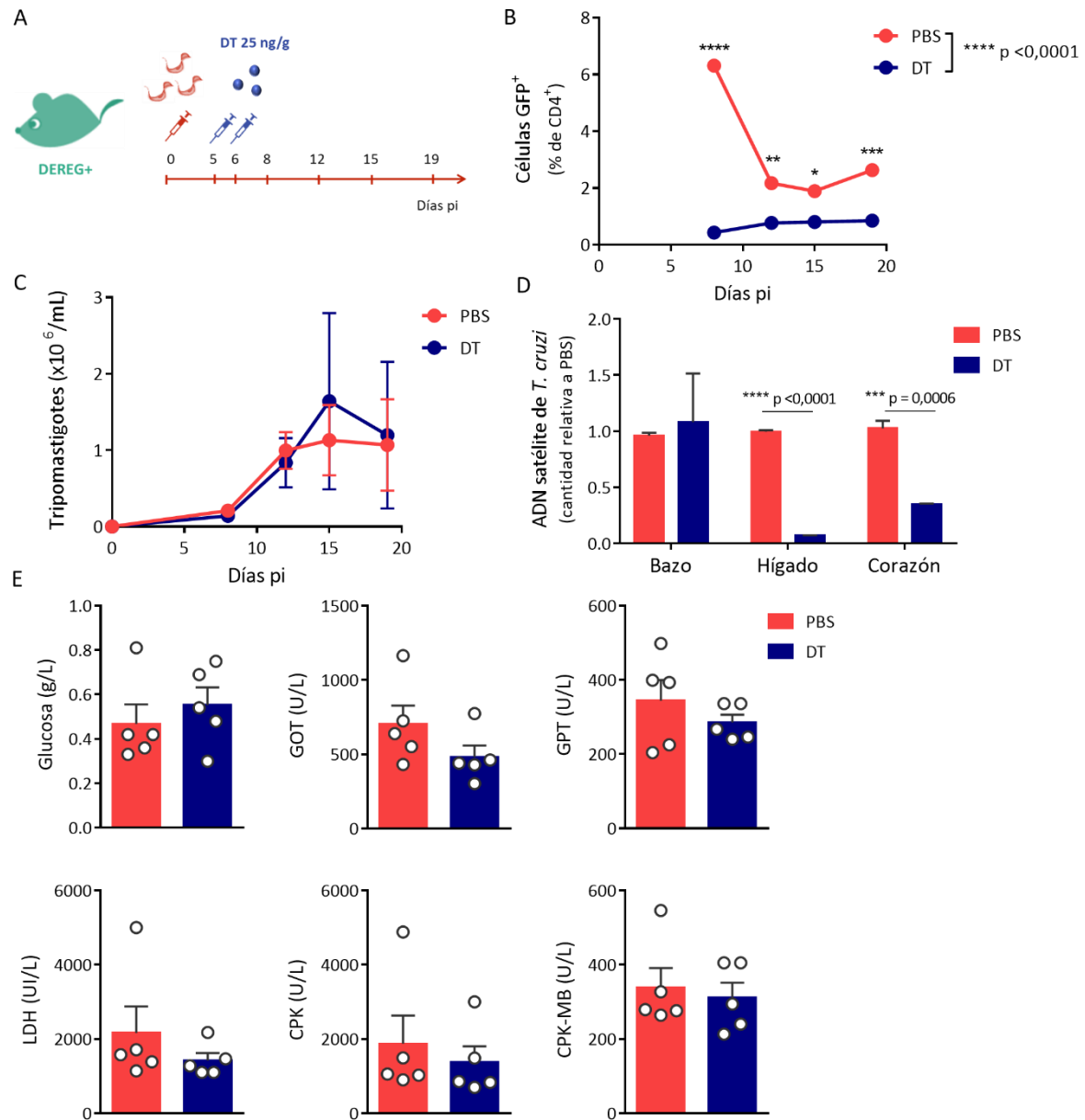


**Figura 45: La eliminación de células Treg al d11-12pi no impacta sobre los números de linfocitos efectores durante infección con *T. cruzi*.**

Gráficos que muestran los números absolutos de células Tconv (CD4<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup>), linfocitos CD8<sup>+</sup> totales y específicos (TSKB20/K<sup>b+</sup>) en bazo a diferentes dpi luego de la inyección de DT o PBS a ratones DEREg+ como en la figura 44. Los datos están graficados como promedio  $\pm$  EEM, corresponden a un n de 2 a 4 animales por grupo según el dpi, y fueron obtenidos en dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías, resultando no significativo para todos los casos.

Dado que los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis indican que las células Treg activadas tendrían características fenotípicas compatibles con la regulación de células dendríticas, y que estudios de nuestro grupo de trabajo indican que la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> específicas para *T. cruzi* surge a partir del d7pi en ratones WT infectados [212], a continuación se rediseñó el esquema experimental adelantando el momento de la eliminación de células Treg mediada por DT. Así, como se observa en el esquema de la figura 46A, ratones DEREg+ se inyectaron con 25 ng/g de DT o PBS como control en los días 5 y 6 pi. En diferentes tiempos posteriores, se monitoreó en sangre la eficiencia de la eliminación, así como también diferentes parámetros de la infección y de la respuesta inmune. Luego, los diversos grupos experimentales de ratones fueron sacrificados al d19pi para evaluar el efecto de la eliminación de células Treg en diferentes órganos. En primer lugar, se comprobó mediante citometría de flujo de sangre que la eliminación de células Treg fue eficiente en animales tratados con DT respecto a los controles que recibieron PBS, incluso hasta el d19pi (figura 46B).

## Resultados II



**Figura 46: La eliminación de células Treg al d5-6pi reduce los niveles de parásitos al d19pi en órganos blancos de la infección por *T. cruzi*.**

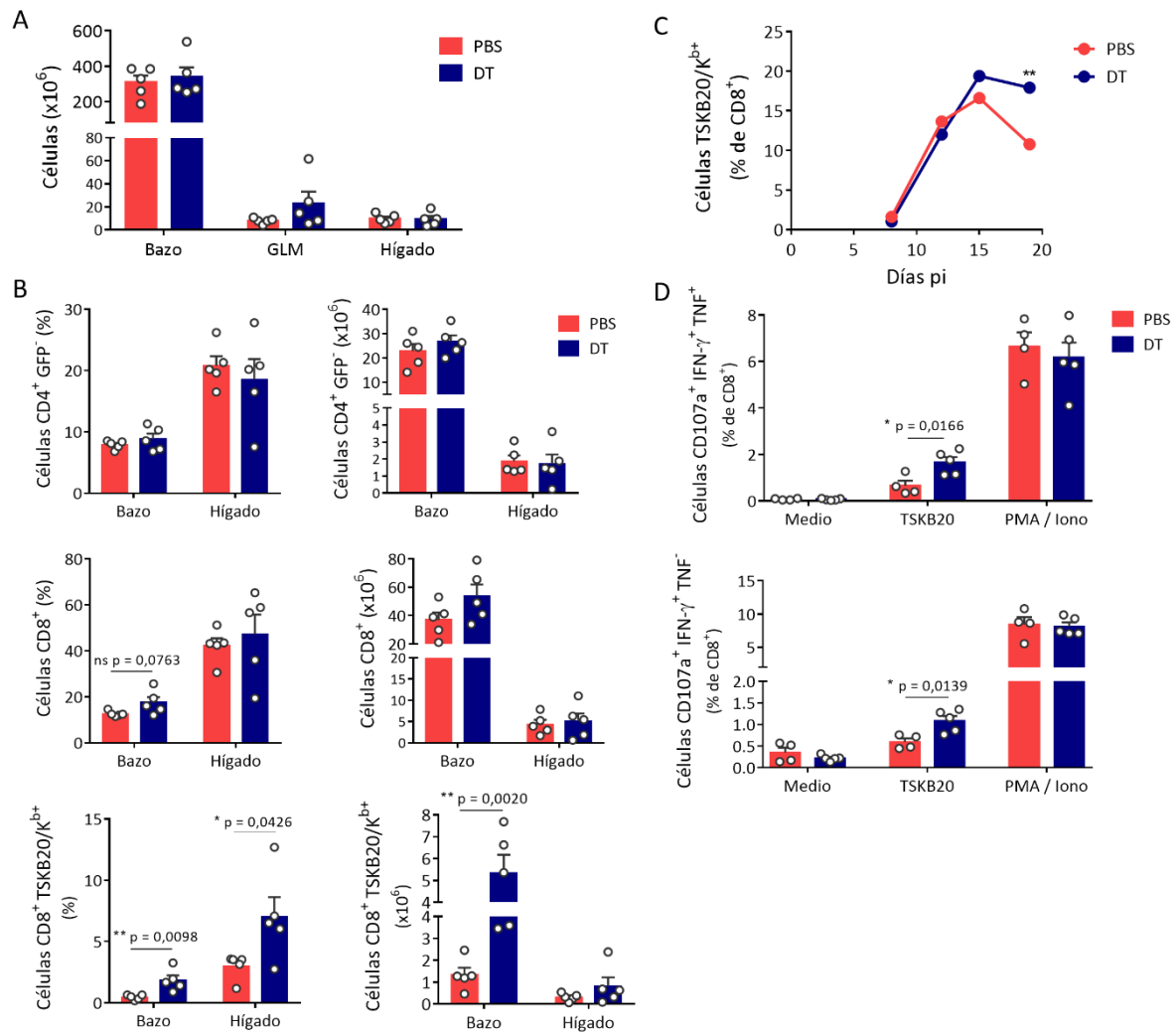
**A)** Ratones DEREK<sup>+</sup> fueron infectados con *T. cruzi*. En los días 5 y 6 pi se les administró 25 ng de DT por g de peso o PBS en forma intraperitoneal. Los animales se monitorearon en sangre a los días 8, 12 y 15 pi, y al d19pi se sacrificaron para el análisis en diferentes órganos. **B-C)** Gráficos que muestran la cinética del porcentaje de células CD4<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> (B) y de los niveles de parásitos (C) en sangre a diferentes dpi luego del tratamiento. **D)** Niveles de parásito al d19pi en bazo, hígado y corazón cuantificado mediante PCR en tiempo real. **E)** Concentración de glucosa y nivel de actividad de las enzimas LDH, GOT, GPT, CPK y CPK-MB en plasma sanguíneo al d19pi. Los datos están graficados como promedio ± EEM. Para B), C) y E) los datos corresponden a un n de 5 a 7 animales por grupo y son representativos de tres experimentos independientes. En el caso del parasitismo tisular los datos corresponden a duplicados y triplicados técnicos provenientes de un conjunto de 4 a 7 animales, y corresponden a dos experimentos independientes para bazo y a uno para hígado y corazón. Los valores p fueron calculados mediante ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples de Sidak, o t-test no apareado, según corresponda. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001.

Al evaluar parámetros de progresión de la infección, se observó que si bien los niveles de parásitos en sangre y en bazo fueron similares en ambos grupos de ratones, la eliminación de células Treg produjo una disminución significativa en la carga parasitaria de órganos blanco de la infección como hígado y corazón al d19pi (figuras 46 C-D). Otros parámetros bioquímicos que evidencian el estado de salud general de los ratones y el daño tisular como concentración plasmática de glucosa y los niveles de actividad de diferentes marcadores bioquímicos de daño no se modificaron significativamente luego de la eliminación (figura 46E). Al estudiar la respuesta inmune efectora, se observó que la eliminación de las células Treg no afecta los números de leucocitos en diferentes órganos (figura 47A). Sin embargo, se advierte un incremento en la frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para *T. cruzi* en bazo, hígado y sangre al d19pi, así como en los números absolutos de estas células en bazo de los ratones infectados y tratados con respecto a los controles (figura 47 B-C). Asimismo, el incremento en la frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos en ratones DREG<sup>+</sup> tratados con DT también se observó en GLM (datos no mostrados). Sin embargo, no se detectaron cambios en los números de células CD8<sup>+</sup> totales y Tconv en bazo e hígado luego del tratamiento con DT.

Con el fin de profundizar en el efecto de la eliminación de células Treg sobre la respuesta inmune efectora anti-parasitaria, se prosiguió a determinar la funcionalidad de las células T CD8<sup>+</sup> inducidas por la infección en animales DREG<sup>+</sup> administrados o no con DT en los días 6 y 7 pi. Para ello, leucocitos obtenidos al d21pi a partir del bazo de los distintos grupos experimentales de ratones se estimularon *in vitro* con el péptido TSKB20 y se evaluó por citometría de flujo la capacidad de las células T CD8<sup>+</sup> para degranular así como para producir las citoquinas efectoras IFN- $\gamma$  y TNF frente al estímulo específico. Células estimuladas con PMA e ionomicina o sin estímulo fueron utilizadas como controles positivos y negativos, respectivamente. Como se observa en la figura 47D, un mayor porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> provenientes de animales infectados tratados con DT es capaz de degranular (CD107a<sup>+</sup>) y de producir TNF y/o IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación con TSKB20 respecto de las células obtenidas de ratones tratados con PBS. En contraste, los porcentajes de células capaces de degranular y producir las citoquinas evaluadas frente al estímulo policlonal con PMA e ionomicina, o a la ausencia de estímulo, fueron similares en ambos grupos experimentales, indicando que la eliminación

## Resultados II

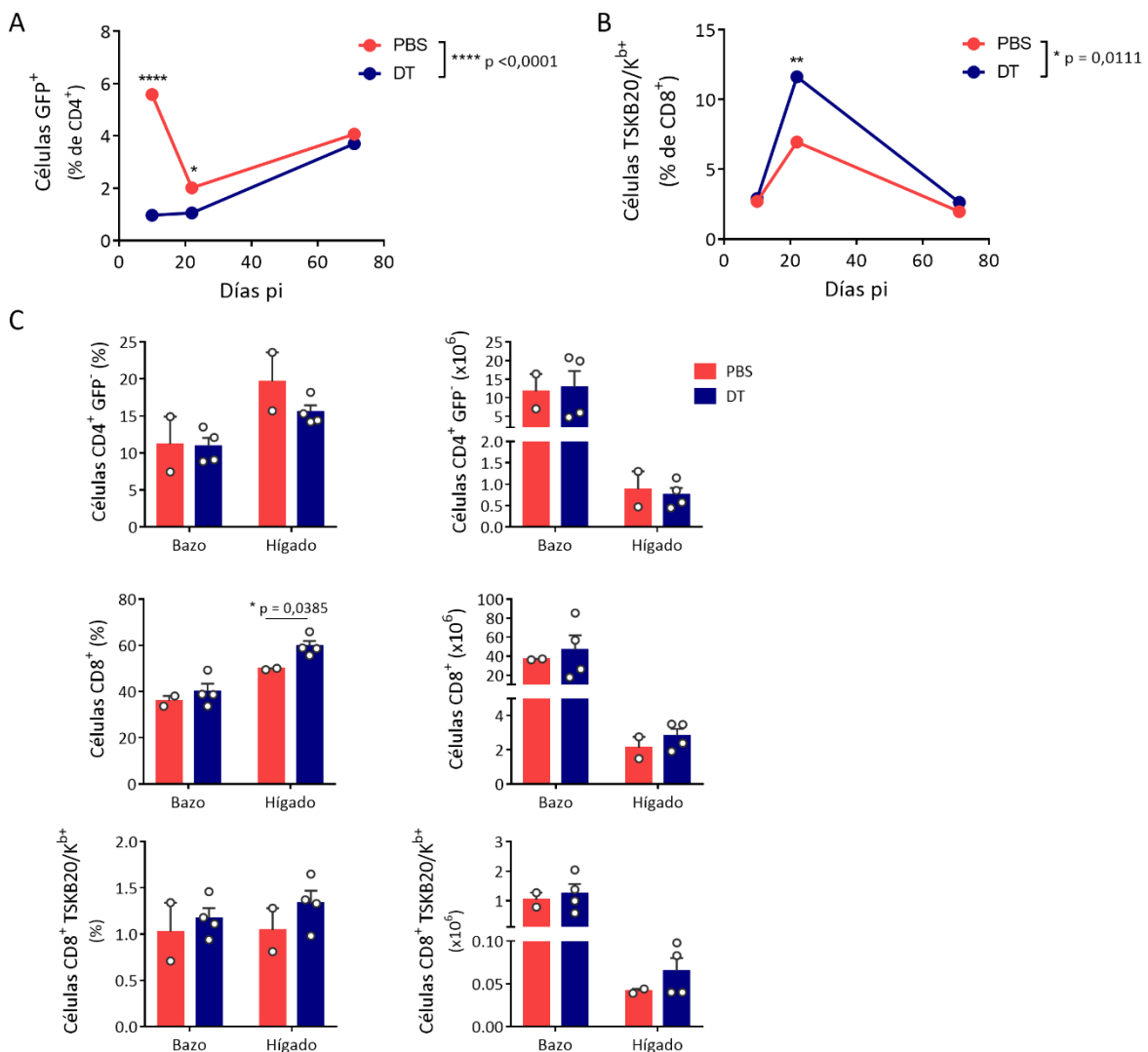
de células Treg incrementa exclusivamente la funcionalidad citotóxica y productora de citoquinas de células T CD8<sup>+</sup> que reconocen específicamente antígenos parasitarios.



**Figura 47: La eliminación de células Treg en momentos tempranos de la infección con *T. cruzi* incrementa los números y la funcionalidad de las células T CD8<sup>+</sup> parásito-específicas.**

**A)** Recuento de leucocitos al d19pi en diferentes órganos de animales DERE<sup>+</sup> infectados con *T. cruzi* y tratados con DT o PBS de acuerdo al esquema en la figura 46A). **B)** Gráficos que muestran la frecuencia (izquierda) y los números absolutos (derecha) de células Tconv (CD4<sup>+</sup> GFP<sup>-</sup>), T CD8<sup>+</sup> totales y específicas (TSKB20/K<sup>b+</sup>) en bazo e infiltrado hepático al d19pi de estos mismos ratones. **C)** Gráficos que muestran la cinética del porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> específicas para *T. cruzi* en sangre de estos ratones. **D)** Ratones DERE<sup>+</sup> se trataron con PBS o DT en los días 6 y 7 pi. Al d21pi se obtuvieron sus esplenocitos y se estimularon *in vitro* durante 5 horas con el péptido TSKB20, o PMA/Ionomicina (PMA/Iono) como control positivo y ningún estímulo (Medio) como control negativo. Los gráficos de barras muestran la frecuencia de células T CD8<sup>+</sup> que degranulan (CD107a<sup>+</sup>) y producen las citoquinas indicadas. Los datos son presentados como promedio + EEM, corresponden a un n de 5 a 7 animales por grupo y son representativos de tres experimentos independientes para A), B) y C), mientras que corresponden a un experimento para D). Los valores p fueron calculados mediante ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples de Sidak, o t-test no apareado, según corresponda. \*\* p < 0,01.

Finalmente, con el objetivo de evaluar si el efecto potenciador de la respuesta CD8<sup>+</sup> anti-parasitaria producto de la eliminación de células Treg se prolonga a tiempos más tardíos de la infección con *T. cruzi*, se examinó la respuesta efectora al d71pi en animales tratados a tiempos tempranos. Así, se observó que la frecuencia de células Treg al d71pi se recuperó en animales tratados con DT al mismo nivel que el de los controles inyectados con PBS (figura 48A). Con respecto a la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> específicas para *T. cruzi*, si bien la frecuencia de estas células se incrementó al d21pi en sangre en los



**Figura 48: La eliminación de células Treg en momentos tempranos de la infección con *T. cruzi* no afecta los números de las células T CD8<sup>+</sup> parásito-específicas en la etapa aguda tardía.**

Ratones DREG+ fueron infectados y se trataron con DT o PBS en los días 6 y 7 pi. **A-B)** Gráficos que muestran la cinética del porcentaje de células CD4<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> (A) y de células CD8<sup>+</sup> específicas para *T. cruzi* (B) en sangre a distintos dpi. **C)** Gráficos de la frecuencia (izquierda) y los números absolutos (derecha) de células Tconv (CD4<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup>), T CD8<sup>+</sup> totales y específicas (TSKB20/K<sup>b+</sup>) en bazo e infiltrado hepático al d71pi. Los datos son presentados como promedio + EEM, y corresponden a un n de 2 a 4 animales por grupo, obtenidos en un experimento. Los valores p fueron calculados mediante ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples de Sidak, o t-test no apareado, según corresponda. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001.

ratones tratados respecto a los controles, al d71pi sus valores de frecuencia y números absolutos fueron semejantes entre ambos grupos de ratones en sangre, bazo e hígado (figuras 48 B-C). Asimismo, la eliminación de células Treg tampoco afectó los números de células Tconv en bazo e hígado, aunque incrementó significativamente la frecuencia y no el número absoluto de células T CD8<sup>+</sup> en hígado (figura 48C). Por último, resulta relevante destacar que la supervivencia no se vio afectada luego de la eliminación de células Treg, dado que todos los ratones, tratados o no, sobrevivieron hasta el d71pi inclusive. En síntesis, estos resultados confirman el rol supresor de las células Treg sobre la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> específicas durante la infección con *T. cruzi*. El efecto de la eliminación de células Treg sería importante a tiempos tempranos de la infección, sugiriendo una función de las células Treg a nivel del control del surgimiento de la respuesta citotóxica específica. Además, las células Treg no solo estarían involucradas en la modulación en los números de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos, sino que también participarían en la supresión de sus funciones efectoras, determinando en última instancia el control parasitario en órganos blanco de la infección.

## Conclusiones

De los resultados descritos en esta segunda parte del trabajo, se puede concluir que durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*:

- El tratamiento con atRA *in vivo* no promueve la generación de células Treg, ni modifica la expresión de Foxp3 y el estado de activación de estas células.
- La administración de atRA a animales infectados mejora el control parasitario, posiblemente como consecuencia del incremento en los niveles plasmáticos de IFN- $\gamma$  y en los números de linfocitos B productores de IL-17A en bazo.
- La diferenciación de células iTreg a partir de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes se potencia *in vitro* mediante el agregado de atRA, incluso cuando las células progenitoras provienen de animales infectados.
- Las células iTreg generadas *in vitro* en presencia de IL-2, TGF- $\beta$  y atRA son estables, expresan altos niveles de CD25 y exhiben capacidad supresora de la proliferación *in vitro*, a pesar de no producir IL-10.



- Las células iTreg también muestran estabilidad *in vivo* en las condiciones inflamatorias generadas por la infección con *T. cruzi*.
- La transferencia adoptiva de células iTreg al d11pi incrementa los niveles de parásitos y reduce la magnitud de la respuesta de células efectoras T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> totales y específicas para *T. cruzi* al momento del pico de la infección, pero no afecta los números de linfocitos B como tampoco la producción de citoquinas efectoras.
- La administración de DT no compromete en sí misma el estado de salud general de animales DREG+ y DREG-.
- La eliminación específica de células Treg al comienzo de la etapa aguda, pero no a momentos posteriores al d10pi, reduce los niveles de parásitos en órganos blanco de la infección, al mismo tiempo que incrementa la magnitud y la funcionalidad de la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> específicas para *T. cruzi* al d20pi.
- La eliminación específica de células Treg en momentos tempranos de la infección no modifica la magnitud de la respuesta citotóxica específica en la fase aguda tardía.

Los resultados de esta segunda parte indican que las células Treg ejercen un rol importante en el control de la magnitud y funcionalidad de poblaciones linfocitarias efectoras durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*. Asimismo, sugieren que la reducción en la frecuencia de células Treg activadas en periferia durante la infección con *T. cruzi* sería necesaria para permitir el desarrollo de una respuesta citotóxica efectora capaz de controlar la replicación parasitaria.



# DISCUSIÓN



Actualmente es reconocido que durante las infecciones, y en especial aquellas que evolucionan a la cronicidad, la respuesta inmune generada es un factor clave que interviene tanto en el control del microorganismo, como en el desarrollo de patología asociada al daño colateral causado por los mecanismos inmunoefectores. Así, la resistencia del hospedador frente a la infección requiere de un balance ajustado de la respuesta inmune efectora, permitiendo que sea adecuada para controlar la replicación del patógeno, pero que al mismo tiempo se minimice el desarrollo de inmunopatología gracias a la puesta en marcha de diversos mecanismos inmunorregulatorios [88]. Esta situación ha sido claramente documentada en el contexto de la infección experimental y humana con *T. cruzi*, donde la magnitud y la calidad de la respuesta inmune efectora desarrollada en la etapa aguda de la infección determinan el control de la replicación parasitaria así como el desarrollo y la evolución de la enfermedad chagásica crónica [213-217]. Asimismo, se ha determinado que algunos mecanismos regulatorios de la respuesta inmune, como por ejemplo la producción de IL-10, son críticos para la resistencia del hospedador en modelos de la infección experimental aguda por *T. cruzi*, y están inversamente asociados a la gravedad de la cardiomiopatía chagásica en pacientes [42-46, 51, 52]. Sin embargo, las células Treg, principal población celular involucrada en inmunorregulación, han permanecido pobremente estudiadas, y aún hoy no se tienen evidencias claras del papel de las mismas en la progresión de la infección con *T. cruzi*. En este contexto, durante este trabajo de tesis se realizó por primera vez un estudio exhaustivo de la respuesta de células Treg durante la etapa aguda de la infección con este parásito, analizando la magnitud de esta respuesta y las características fenotípicas, funcionales y transcripcionales de estas células. Los resultados aquí expuestos demuestran que las células Treg son activadas por la infección para producir citoquinas supresoras y expresar una gran variedad de moléculas que intervienen en la función regulatoria. Asimismo, se demostró que las células Treg de animales infectados adquieren programas especializados en el control de respuestas inflamatorias tipo 1 y en la reparación tisular. Los resultados obtenidos también permitieron describir la cinética de evolución de la respuesta de células Treg y su correlación con el surgimiento de las respuestas efectoras, los niveles de *T. cruzi* y el desarrollo de daño tisular. Así, se demostró que la infección induce una reducción marcada en la frecuencia de células Treg en órganos linfáticos periféricos y en hígado a lo largo de la fase aguda. Además, se

demonstró que la frecuencia de las células Treg en bazo se correlaciona inversamente con los niveles de tripomastigotes y de diversos marcadores bioquímicos de daño en sangre, así como también, con la concentración plasmática de citoquinas pro-inflamatorias y de IL-10.

Los reportes sobre las células Treg durante las infecciones describen una gran diversidad en esta respuesta regulatoria, que obedece entre otras variables, a las diferentes características de progresión de las infecciones [69, 218]. Así, durante distintas infecciones crónicas como malaria [219], leishmaniasis [220-222], lepra [223, 224], tuberculosis [225, 226] y las infecciones por VIH [227] y VHB [228], la acumulación de células Treg en sitios de infección, órganos linfoides secundarios y sangre ha sido ampliamente descrita. En contraste, el comportamiento y la función de la respuesta de células Treg en el curso de las infecciones agudas o en la fase aguda de las infecciones crónicas aún no están esclarecidos. Se ha reportado un incremento en los números absolutos y/o la frecuencia de células Treg a tiempos tempranos en la infección experimental con *Plasmodium falciparum* en sangre de individuos humanos [229] y con Virus de Herpes Simple tipo 1 y tipo 2 en sitios de infección y ganglios de animales infectados [146, 230]. Por el contrario, los números absolutos y/o la frecuencia de células Treg se vieron disminuidos en modelos experimentales de las infecciones agudas por *Toxoplasma gondii* [147, 148], *Listeria monocytogenes* [148], Virus Vaccinia [148] y Virus de Coriomeningitis Linfocítica [231].

Hasta el inicio de esta tesis, no existían reportes sobre la evolución de la magnitud de la respuesta de células Treg en modelos experimentales de la infección con *T. cruzi*. Debido a ello, al comienzo de este trabajo se estudió detalladamente la cinética de la respuesta de células Treg a lo largo de la fase aguda de la infección con *T. cruzi*, demostrándose una reducción en el porcentaje de estas células en circulación sanguínea y en diferentes órganos como bazo, ganglios inguinales e hígado. A su vez, se determinó que esta disminución no es producto de una reducción en los números absolutos de las células Treg presentes en estos órganos, sino consecuencia de un incremento desproporcionado en los números absolutos de las otras poblaciones leucocitarias presentes. Recientemente, un trabajo publicado por el grupo de la Dra. Ana Rosa Pérez (IBR, Rosario) reportó la disminución en el porcentaje de células Treg esplénicas y en la relación entre los números de células Treg y Tconv de bazo durante una infección aguda y

letal con *T. cruzi* [163]. En conjunto, el trabajo publicado por el grupo de la Dra. Pérez y nuestros resultados extendidos a diversos tejidos linfoides y no-linfoides y a tiempos prolongados de la infección, demuestran que a diferencia de la mayoría de las infecciones crónicas de origen parasitario, bacteriano y viral, donde se observa un incremento del número y/o frecuencia de las células Treg, en la infección experimental con *T. cruzi* se produce una dramática disminución en la frecuencia de esta población en la etapa aguda, que no parece restaurarse a valores normales con la progresión de la infección.

A continuación, se profundizó el estudio sobre las causas asociadas a la reducción en la frecuencia de células Treg en periferia. Así, se demostró que esta disminución no obedece a un desarrollo atenuado de estas células en timo ni a un incremento preferencial en la apoptosis de esta población. En contraste, la reducción relativa de las células Treg estaría relacionada a una limitación en la inducción de células Treg en periferia durante la infección con *T. cruzi*, principalmente en ganglios linfáticos mesentéricos, y a una baja tasa de proliferación de las células Treg esplénicas en comparación con las otras poblaciones leucocitarias de bazo. Estos resultados corroboran pero también complementan los hallazgos reportados por González y colaboradores, que asociaron la merma de la relación entre células Treg y Tconv a un menor índice de proliferación en las primeras, pero no evaluaron la inducción de células Treg durante la infección [163].

En relación a los resultados descriptos, resulta interesante discutir las posibles causas de una proliferación limitada de las células Treg. Actualmente es aceptado que la competición por factores de crecimiento y sobrevivencia controla el tamaño de la población de células Treg *in vivo* [232]. Como se mencionó previamente, IL-2 se considera un factor crítico tanto para la generación de células tTreg y pTreg, como para la proliferación de estas células en órganos linfoides secundarios [97]. Las células Treg son altamente sensibles a las respuestas de IL-2 gracias a la alta expresión constitutiva de CD25, la cadena  $\alpha$  de alta afinidad del receptor para esta citoquina, la cual incluso aumenta su expresión una vez que estas células han sido activadas. Numerosos reportes previos demostraron que la producción de IL-2 está suprimida durante la infección con *T. cruzi* [233-235]. Resultados obtenidos en este trabajo confirman que la concentración sistémica de IL-2 no se modifica a lo largo de la fase aguda de la infección, y además demuestran que los niveles de esta citoquina no se correlacionan con la frecuencia de

células Treg esplénicas. Más aún, González y colaboradores reportaron que si bien existe un nivel de expresión de IL-2 constante en bazo durante la infección letal con *T. cruzi*, la baja producción de IL-2 no sería responsable de la menor capacidad proliferativa observada en las células Treg respecto de las otras poblaciones leucocitarias de bazo, ya que el tratamiento con IL-2 recombinante no favorece los números de células Treg esplénicas respecto a los de Tconv [163].

Adicionalmente, existen mecanismos independientes de IL-2 que actúan en el mantenimiento de las células Treg, y si bien han sido poco estudiados, varían de acuerdo al tejido y a las subpoblaciones de estas células. Así, se ha descrito que la señalización a través de ICOS es requerida para el mantenimiento de células Treg con fenotipo “efector” en tejidos no linfoides, donde los niveles de IL-2 son limitados [137]. Además, IL-7 sería necesaria para el mantenimiento de células Treg de memoria en la piel [126], y, si bien se considera que las células Treg se caracterizan por expresar bajos niveles de la cadena  $\alpha$  de su receptor (CD127), se ha reportado que las células Treg pueden incrementar la expresión de esta molécula de acuerdo a su localización y luego de su activación [125]. Por otra parte, IL-15 participaría en la acumulación de células Treg con la edad, al declinar los niveles de IL-2 [236]. En este sentido, la proliferación de las células Treg durante la infección por *T. cruzi* podría depender de factores diferentes a IL-2. Los resultados descritos en este trabajo de tesis apuntan a un incremento en los niveles del transcripto de *Icos* y de la proteína CD127 en las células Treg al momento del pico de la infección con *T. cruzi*. Un análisis más profundo del efecto de la señalización por ICOS y por CD127, además de otros factores, es necesario para determinar si estas moléculas afectan la proliferación de las células Treg durante esta infección.

Además de los defectos en la proliferación de las células Treg, los resultados de este trabajo muestran, por primera vez, una inducción deficiente de células pTreg durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*. Mediante experimentos de transferencia adoptiva, se demostró que la infección previene la expresión de Foxp3 en células Tconv en diferentes órganos, y por ende, la generación de células pTreg. Se ha reportado que las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 $\beta$  bloquean la inducción de células pTreg al mismo tiempo que promueven la diferenciación de linfocitos vírgenes hacia el perfil Th17 [176-178]. En este sentido, en esta tesis se demostró que el modelo de infección experimental con *T. cruzi* utilizado cursa con una inducción significativa en la



concentración plasmática de IL-6, cuyo incremento se asocia moderadamente con la disminución de la frecuencia de células Treg esplénicas, mientras que no se observaron cambios a nivel de la concentración sistémica de IL-1 $\beta$  en los tiempos evaluados. Además, nuestro grupo de investigación ha demostrado la inducción de células Th17 durante la infección con *T. cruzi* [159], sugiriendo que la disminución en la frecuencia de células Treg podría ser consecuencia de una diferenciación preferencial de las Tconv hacia un perfil Th17. Sin embargo, los resultados de este trabajo de tesis indican que los animales deficientes en IL-6 e IL-1 $\beta$ , e infectados con *T. cruzi*, no incrementan los números absolutos ni la frecuencia de células Treg en bazo y GLM respecto de los controles WT infectados, sugiriendo que estas citoquinas no intervienen en la reducción de la proporción de células Treg respecto de las otras poblaciones leucocitarias de bazo. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que los IFNs tipo I inhiben la generación de células pTreg [237], pero al igual que anteriormente, los animales deficientes en el receptor de estas citoquinas e infectados no modificaron los números de células Treg en comparación con ratones WT infectados (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados sugieren que las principales citoquinas pro-inflamatorias previamente reportadas en la literatura por su rol en el bloqueo de la diferenciación a células Treg, no están involucradas en la reducción de la frecuencia de células Treg en periferia observada durante la infección con *T. cruzi*.

Otros escenarios posibles, en los que no interviene la inhibición por citoquinas pro-inflamatorias, podrían afectar la generación de células pTreg durante la infección con *T. cruzi*. Uno de ellos podría involucrar una reducción en los niveles de TGF- $\beta$  durante esta infección, dado que como se mencionó previamente, esta citoquina es requerida para la diferenciación hacia el perfil Treg en periferia pero no en timo [238, 239]. Apoyando esta hipótesis, se ha reportado una menor expresión de esta citoquina en bazo de ratones infectados [163] y un bajo nivel de expresión de TGF- $\beta$  por células dendríticas estimuladas con *T. cruzi* [240]. La reducción en los niveles de otros factores inmunosupresores durante la infección también podría jugar un papel en la limitación de la inducción de células Treg, dado que en un modelo de ratones deficientes en Galectina-1 infectados con *T. cruzi* se observó una menor frecuencia de células Treg en bazo respecto de los animales WT control [241]. Además, se ha demostrado que metabolitos producidos por la microflora comensal, particularmente ácidos grasos de cadena corta, promueven la

diferenciación de células pTreg en intestino e incrementan la proliferación de las células Treg intestinales existentes [77, 242, 243]. El efecto contrario es producido mediante la señalización a través de PRRs, dado que se ha reportado que el ADN de la microbiota inhibe la generación de células Treg intestinales a través de la señalización por TLR9 en células dendríticas [244]. Incluso, la infección con el parásito *Encephalitozoon cuniculi* en ratones deficientes en TLR9 incrementa los niveles de células Treg en intestino y reduce las respuestas inflamatorias tipo 1 y 17 características en comparación con animales WT [244]. Teniendo en cuenta que TLR9 es uno de los principales PRRs mediante los cuales se sensa la presencia de *T. cruzi* [7, 24], resultaría relevante estudiar el rol de la señalización a través de este receptor sobre la inducción de células pTreg en esta infección. En este sentido, es importante destacar que los estudios de cinética mostrados en esta tesis indican que existe una asociación fuerte e inversa entre la frecuencia de células Treg esplénicas y los niveles de *T. cruzi* en sangre. Así, altas parasitemias estarían relacionadas a una alta producción de ligandos de TLR9 que podrían inhibir la inducción de células pTreg indirectamente al modular la actividad de células dendríticas o directamente actuando sobre las células Tconv que expresan este receptor [245].

Además del estudio de la evolución de la respuesta de células Treg durante la infección con *T. cruzi*, se propuso hacer una evaluación precisa de la relevancia de esta población en la progresión de la infección. Los reportes previos abocados a evaluar el rol de las células Treg en modelos experimentales de la infección con *T. cruzi* mostraron resultados contradictorios en cuanto a su papel en la magnitud y funcionalidad de la respuesta inmune efectora, el control del parásito y la resistencia a la infección, y el desarrollo de patología tisular. Así, Kotner y colaboradores reportaron que las células Treg exhiben un rol limitado en el control de la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> específicas para el péptido TSKB20, que no afecta la parasitemia ni la sobrevivencia de los animales [154], mientras que Mariano y colaboradores mostraron que las células Treg son necesarias para controlar el infiltrado leucocitario y los niveles de parásito en sangre y corazón, y prevenir el desarrollo de miocarditis y la muerte de los ratones [152]. Por el contrario, Sales y colaboradores describieron que las células Treg tienen un papel en el control de la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, pero no sobre la producción de citoquinas efectoras ni en el control del infiltrado inflamatorio cardíaco, aunque favorecerían la replicación parasitaria y la muerte de los animales infectados [153]. Todos estos reportes se basaron

en la eliminación de esta población celular antes de la infección o durante la fase aguda, mediante la administración de anticuerpos dirigidos contra moléculas (CD25 y GITR) que no son expresadas exclusivamente por las células Treg. Además, ninguno de estos trabajos determinó la evolución de los números de células Treg en animales infectados como estrategia racional para determinar el momento de intervención adecuado sobre la respuesta regulatoria.

En este contexto, el diseño experimental de esta tesis se basó en tecnologías más modernas para la evaluación de la función biológica de las células Treg, haciendo uso de ratones modificados genéticamente que facilitaron la identificación de esta población y su eliminación selectiva, y también ratones deficientes que permitieron el estudio de las señales específicas involucradas en su inducción. De esta forma, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis demuestran que la disminución en la frecuencia de células Treg durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi* es necesaria para que surja la respuesta inmune efectora capaz de controlar los niveles de parásito. Mediante la manipulación en los números de células Treg, a través de transferencia adoptiva y por eliminación específica de esta población celular, se determinó que el principal efecto sobre la respuesta inmune efectora reside en el control de la magnitud de la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> específicas para el parásito durante la fase aguda de la infección. En concordancia con estos resultados, se demostró además la existencia de una asociación moderada entre la disminución del porcentaje de células Treg esplénicas y el surgimiento de la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para el péptido TSKB20 de *T. cruzi* en bazo.

La supresión de las respuestas de linfocitos citotóxicos por parte de las células Treg ha sido previamente reportada en infecciones virales crónicas, donde se describió que las células Treg inhiben la proliferación, la capacidad de producir citoquinas y la función efectora citotóxica de células T CD8<sup>+</sup> específicas para antígenos virales, además de contribuir a establecer un fenotipo agotado en ellas [246]. De forma importante, en estas infecciones crónicas la acción de las células Treg no fue antígeno-específica, ya que luego de ser activadas por el contexto inflamatorio, las células Treg fueron capaces de suprimir células T CD8<sup>+</sup> específicas para antígenos no relacionados a la infección, como ovoalbúmina y antígenos de otros virus, así como también suprimieron reacciones linfocitarias mixtas *in vitro*. Con respecto a la especificidad de la respuesta regulatoria en la infección con *T. cruzi*, los experimentos realizados en este trabajo muestran que son

variaciones en los números de células Treg policlonales las que controlan la respuesta citotóxica específica para *T. cruzi*, sugiriendo que la supresión de esta respuesta efectora durante la infección no requeriría estrictamente una respuesta regulatoria antígeno-específica.

Otro aspecto importante y ampliamente discutido en el campo de estudio de la regulación inmune corresponde al blanco sobre el que las células Treg ejercen su función efectora. En este sentido, las células Treg inducidas durante las infecciones pueden ejercer acción supresora directa sobre linfocitos T CD8<sup>+</sup> como se mencionó previamente, pero también sobre otras poblaciones celulares, como células T CD4<sup>+</sup>, células NK y células presentadoras de antígenos. Se ha reportado que durante infecciones crónicas las células Treg inhiben la proliferación y la producción de citoquinas por parte de células Tconv policlonales y antígeno-específicas, y regulan la proliferación, maduración y diferenciación de células NK mediante la privación de IL-2, quienes expresan solo el receptor de baja afinidad para esta citoquina [246]. Otra célula blanco importante de las células Treg corresponde a las células dendríticas, quienes son reguladas mediante la formación de conjugados por interacciones prolongadas entre ambas células. De esta forma, las células Treg son capaces de inhibir la maduración de las células dendríticas e impedir el acceso a ellas por parte de linfocitos, con lo cual se ve afectada indirectamente la activación de las respuestas de células T.

Como se describió más arriba, en este trabajo de tesis se demostró que la acción supresora de las células Treg durante la infección por *T. cruzi* afecta principalmente a la respuesta de células T CD8<sup>+</sup>, si bien probablemente también afecte a la de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Teniendo en cuenta que esta infección incrementa en las células Treg la expresión de una gran variedad de moléculas de función supresora, con capacidad de actuar tanto sobre linfocitos como sobre células presentadoras de antígenos, los efectos sobre las poblaciones linfocitarias mencionadas pueden ser consecuencia de la acción supresora directa sobre estos linfocitos o de la acción indirecta a través de la inhibición de las células dendríticas. En este sentido, los experimentos de transferencia adoptiva, donde las células Treg fueron inyectadas en tiempos posteriores al comienzo del surgimiento de las respuestas linfocitarias, sugieren que las células Treg podrían suprimir directamente a las células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, así como también actuar indirectamente sobre estas respuestas a través de la inhibición de células accesorias involucradas en su inducción. Estudios a ser

abordados como perspectivas de esta tesis incluirán estudios fenotípicos de los linfocitos T para determinar si la transferencia de células Treg afecta su estado de activación y su función efectora, favoreciendo el agotamiento y la disfunción de las células T CD8<sup>+</sup>. Por otro lado, el hecho de que la eliminación de células Treg impacte sobre los números de células T CD8<sup>+</sup> parásito-específicas cuando es llevada a cabo a tiempos tempranos de la infección, pero no luego del d10pi, sugiere que en este caso, el control de las células Treg sobre los linfocitos T CD8<sup>+</sup> ocurre al momento de la inducción de la respuesta citotóxica, probablemente mediante la supresión de células dendríticas. En este sentido, el estudio fenotípico de las células Treg demostró que la infección con *T. cruzi* incrementa notablemente en estas células la expresión de CTLA-4, molécula capaz de inducir un estado inmaduro en las células presentadoras de antígenos. Asimismo, en las células Treg de animales infectados se detectó un aumento en la expresión de otras moléculas que participan de esta interacción, como LAG-3, GITR y TIGIT. Estos resultados se conciben con un reporte reciente de Ersching y colaboradores, donde en un modelo de estudio de la inducción de respuestas citotóxicas por parte de células dendríticas estimuladas con *T. cruzi*, las células Treg suprimen la inducción de células T CD8<sup>+</sup> específicas para un péptido de ovoalbúmina a través de CTLA-4 y TGF- $\beta$ , pero en forma independiente de IL-10 [240]. Más aún, en forma similar a nuestros resultados, estos autores observaron que la eliminación selectiva de células Treg en días consecutivos inmediatamente posteriores a la infección con la cepa Y de *T. cruzi* incrementa los números de linfocitos T CD8<sup>+</sup> parásito-específicos al d22pi [240]. Si, de acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos de eliminación de células Treg en esta tesis y los reportados por Ersching y colaboradores, postulamos que la función principal de las células Treg durante la infección con *T. cruzi* reside en inducir un estado inmaduro en las células dendríticas que previene la inducción de respuestas citotóxicas, resulta lógico que en los experimentos de supresión *in vitro* las células Treg purificadas de animales infectados no presentaran incrementada su capacidad inhibitoria directa sobre células Tconv y T CD8<sup>+</sup>.

En cuanto al efecto sobre la replicación parasitaria, los resultados presentados en los experimentos de manipulación del número de células Treg demuestran que cambios en los números de estas células durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi* afectan los niveles del parásito principalmente en hígado y corazón, y probablemente también en sangre y bazo, mientras que no parecen alterar el desarrollo de daño tisular, al menos en

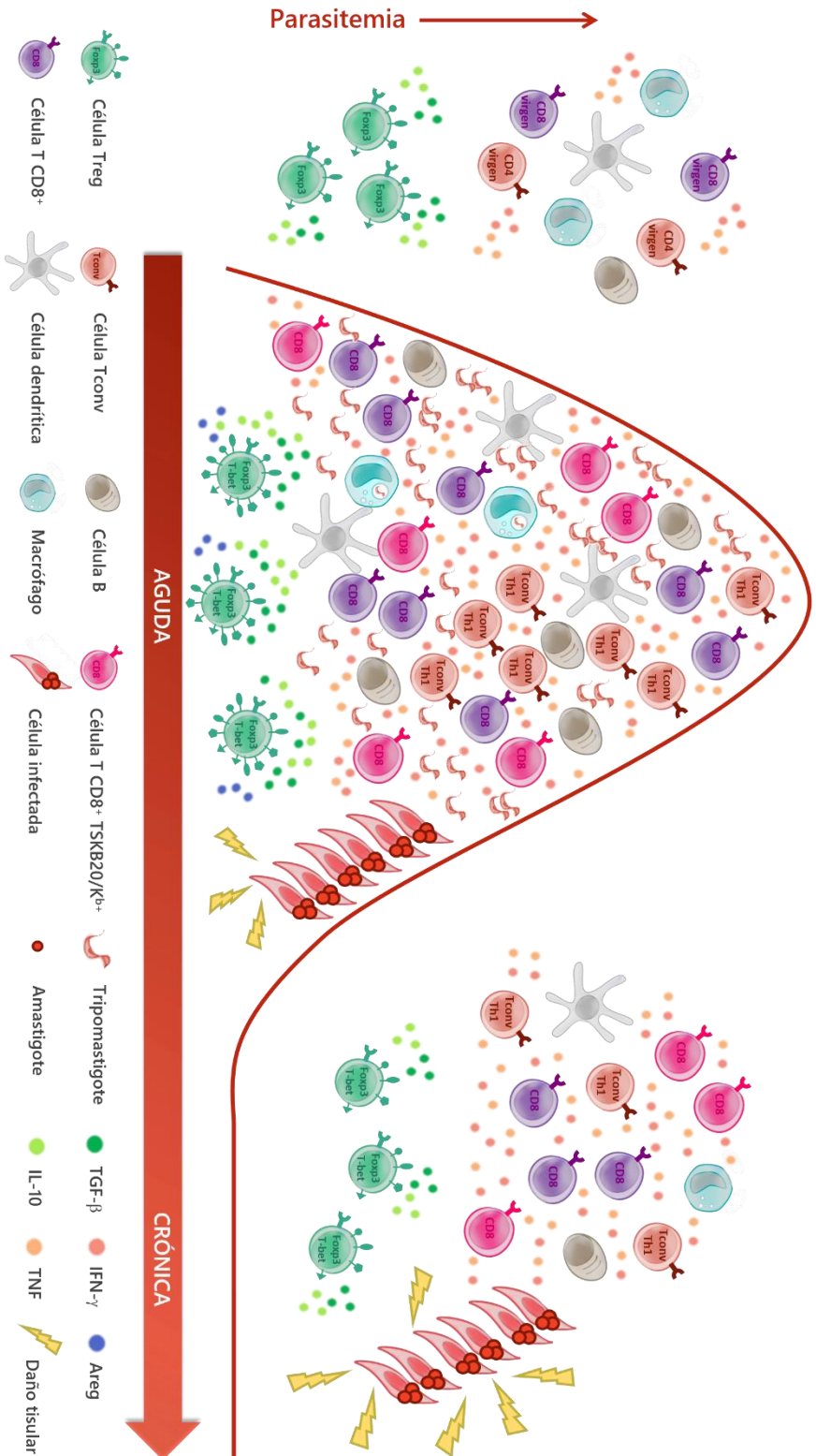
esta etapa. Con respecto a la relevancia biológica de las células Treg de la etapa aguda sobre el desarrollo de patología crónica, se observó que la eliminación de células Treg a tiempos tempranos genera una tendencia a la disminución en la actividad plasmática de la enzima CPK de animales infectados al d71pi (datos no mostrados), sugiriendo un menor daño muscular en estos ratones. Resta confirmar a nivel histológico un menor daño cardíaco en estos animales, y establecer si sería consecuencia del incremento de la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la etapa aguda, que resulta en un mejor control de la replicación del parásito y en una menor carga parasitaria en tejidos. En este sentido, la persistencia del parásito es también un factor importante en el desarrollo de patología crónica, ya que se ha reportado la presencia de *T. cruzi* en lesiones tisulares cardíacas de pacientes con cardiomiopatía chagásica pero no en aquellos que exhiben la forma indeterminada de la enfermedad [14], y se ha descrito que al analizar el perfil transcripcional de células de sangre, pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica moderada exhiben mayores niveles de expresión de genes relacionados a las vías citotóxicas de células T CD8<sup>+</sup> y NK respecto de aquellos pacientes que presentan una forma severa de esta patología [247].

Finalmente, resulta interesante discutir los resultados de esta tesis en función de los reportes que sugieren un papel protector para las células Treg en el contexto de la infección humana [48, 149-151]. Como se describió en la introducción, en estos trabajos una mayor frecuencia de células Treg en sangre periférica de pacientes chagásicos se correlacionó inversamente con el grado de severidad de la patología cardíaca. La aparente contradicción entre estos hallazgos y los de esta tesis son explicables considerando que la etapa de la infección en la cual se evaluó el papel de las células Treg es diferente. Así, los resultados de esta tesis indican que la reducción en la frecuencia de las células Treg durante la fase aguda es crítica para la generación de la respuesta inmune efectora y el control de la replicación parasitaria, sugiriendo un papel deletéreo de esta población celular regulatoria durante esta etapa. Sin embargo, el papel de estas mismas células puede cambiar a lo largo de la infección, hasta llegar a la etapa crónica donde, como ha sido sugerido ampliamente, la regulación de la respuesta inmune efectora es necesaria para evitar un daño sostenido a los tejidos del hospedador infectado [9, 17, 18]. De hecho, teniendo en cuenta que los resultados aquí presentados muestran que la frecuencia de células Treg aún se mantiene en niveles reducidos a tiempos tardíos de la

fase aguda previos al comienzo de la etapa crónica, es posible que la disminución en la frecuencia de células Treg durante la fase crónica favorezca el desarrollo de inmunopatología. En este contexto, surge como perspectiva de esta tesis la importancia de analizar si variaciones en la magnitud de la respuesta de células Treg durante la etapa crónica pueden modular la respuesta efectora, la persistencia de *T. cruzi* y la inmunopatología en la infección experimental.

Integrando los resultados obtenidos en esta tesis y los existentes en la literatura, se propone el siguiente modelo sobre el papel de las células Treg a lo largo de las distintas etapas de la infección con *T. cruzi* (figura 49). Durante la etapa aguda, las células Treg se activan y adquieren un perfil especializado en la inhibición de respuestas tipo 1. Sin embargo estas células no se acumulan en órganos linfáticos secundarios y tejidos no-linfoides como ha sido reportado en otras infecciones crónicas. Esto se debería a características del propio microorganismo y/o de la respuesta inmune generada, que limitan la proliferación de las células Treg y la inducción de células pTreg. Así, a medida que la infección transcurre, se produce un desfase entre la acumulación de poblaciones celulares efectoras y el número de células Treg, lo cual es esencial para el surgimiento durante la etapa aguda de la respuesta citotóxica parásito-específica capaz de controlar parcialmente la replicación parasitaria. Posteriormente, luego de que la respuesta inmune efectora es capaz de eliminar al parásito en circulación y reducir la replicación parasitaria en tejidos, se produce la contracción del número de células efectoras del sistema inmune, la disminución del estado inflamatorio general y una recuperación de la frecuencia de células Treg. Cabe destacar, que esta regulación cruzada y el equilibrio entre las respuestas regulatorias y efectoras puede ser alterado si se adelanta la contracción relativa de la respuesta regulatoria. Así, la disminución terapéutica de células Treg a tiempos más tempranos que el observado durante la infección natural resulta en un incremento de la magnitud, aunque no una aceleración, de la inmunidad antiparasitaria y un mayor control de la replicación parasitaria en la etapa aguda, lo cual redundaría en una patología crónica de menor severidad. Este papel aparentemente deletéreo de las células Treg en la fase aguda de la infección con *T. cruzi*, evolucionaría hacia un papel beneficioso en la fase crónica. En esta etapa, la capacidad de las células Treg para suprimir respuestas inflamatorias de larga duración sería crítica para controlar el daño en tejidos y la inmunopatología como sugieren los estudios en humanos. Confirmar este

modelo requerirá de nuevos proyectos abocados al estudio de la respuesta regulatoria durante la etapa aguda de la infección humana así como al análisis del efecto de la manipulación de las células Treg en la etapa crónica de la infección experimental.



**Figura 49: Modelo de acción de las células Treg en la progresión de la infección con *T. cruzi*.**

Luego de la infección con *T. cruzi*, el parásito induce una respuesta inmune robusta de tipo 1 en la que participan células de la inmunidad innata y adaptativa. Durante esta fase aguda, las células Treg incrementan la expresión de una gran diversidad de moléculas con función supresora y adquieren un perfil especializado en el control de las respuestas inflamatorias tipo 1 y en la reparación tisular. Sin embargo, las células Treg no se acumulan en órganos linfáticos ni en tejidos no-linfoideos, permitiendo el surgimiento de la respuesta de células T CD8+ específicas para el péptido TSKB20 de *T. cruzi* que es capaz de controlar al parásito. De esta forma, los niveles de parásito en sangre se tornan indetectables y como consecuencia se contraen las respuestas efectoras. A pesar de ello, el *T. cruzi* no es eliminado completamente y persiste en los tejidos, por lo que la infección progresa a la cronicidad. A diferencia de la fase aguda, durante la etapa crónica las células Treg tendrían un rol beneficioso al controlar las respuestas inflamatorias de larga duración que resultan en daño tisular e inmunopatología.



# MATERIALES Y MÉTODOS



## Animales de experimentación

Durante el presente trabajo de tesis se utilizaron los siguientes ratones salvajes o modificados genéticamente:

- **Ratones WT (del inglés “wild-type”, salvajes):** ratones C57BL/6 (B6) endocriados en nuestro Instituto a partir de progenitores suministrados por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Esta cepa comparte el fondo o “background” genético con los ratones transgénicos empleados en este trabajo, por lo que se utilizaron como controles. Además, de relevancia para esta tesis, expresan el alelo CD45.2 en todas sus células de origen hematopoyético, y por lo tanto las células del sistema inmune son trazables mediante el empleo de anticuerpos específicos. Por otro lado, presentan el haplotipo *b* de las moléculas CMH clase I (H2-K<sup>b</sup> y H2-D<sup>b</sup>) expresados en todas las células nucleadas.
- **Ratones Foxp3-GFP:** ratones B6.Cg-Foxp3<sup>tm2Tch</sup>/J, adquiridos en The Jackson Laboratory (EEUU; n° de stock JAX: 006772) y endocriados en nuestro Instituto. Esta cepa posee el cassette IRES-eGFP-SV40 poli-A inmediatamente downstream del codón STOP del gen de Foxp3 endógeno, pero upstream de la señal poli-A endógena, por lo cual GFP y Foxp3 se co-expresan como dos proteínas separadas [161]. Esto facilita la identificación de las células que expresan el factor de transcripción Foxp3 mediante citometría de flujo. Por otro lado, dado que el fondo genético de estos animales es C57BL/6, sus células hematopoyéticas expresan el alelo CD45.2, mientras que sus moléculas CMH clase I corresponden al haplotipo *b*.
- **Ratones WT CD45.1:** animales B6.SJL-Ptprc<sup>a</sup> Pepc<sup>b</sup>/BoyJ, fueron adquiridos en The Jackson Laboratory (EEUU; n° de stock JAX: 002014) y endocriados en nuestro Instituto. Estos animales si bien tienen el background genético C57BL/6, expresan el alelo CD45.1 en sus células hematopoyéticas. Sus moléculas CMH clase I corresponden al haplotipo *b*.
- **Ratones IL-6 KO:** ratones B6.129S2-Il6<sup>tm1Kopf</sup>/J se obtuvieron de The Jackson Laboratory (EEUU; n° de stock JAX: 002650) y fueron endocriados en nuestro Instituto. Estos animales tienen delecionado el gen de IL-6 [248]. Su background genético es C57BL/6.

- **Ratones Caspasa-1/11 KO:** ratones B6N.129S2-Casp1<sup>tm1Flv</sup>/J, se adquirieron en The Jackson Laboratory (EEUU; n° de stock JAX: 016621) y fueron endocriados en nuestro Instituto. Estos animales portan una delección del gen *Casp1*, y de *Casp4* en forma incidental. Su fondo genético es C57BL/6 [249].
- **Ratones IFNAR KO:** los ratones *Ifnar1*<sup>tm1Ag</sup> contienen un casete de inserción en el exón 3 (posición correspondiente al aminoácido 88) del gen del receptor 1 de interferones alfa y beta, en un fondo genético C57BL/6 [250]. Por lo tanto, las células de estos ratones que expresan el gen con la inserción no responden a los interferones de tipo I. Estos animales se obtuvieron del Instituto Pasteur (Francia) y fueron endocriados en nuestro Instituto.
- **Ratones Foxp3-GFP IFNAR KO (IFO):** ratones generados en nuestro Instituto a partir de la cruce de la cepa Foxp3-GFP con la cepa IFNAR KO. Estos animales son por lo tanto capaces de co-expresar Foxp3 y GFP pero no de responder a los interferones de tipo 1. Al igual que las cepas que le dan origen, estos ratones presentan un fondo genético C57BL/6.
- **Ratones Dereg:** los ratones C57BL/6-Tg(Foxp3-DTR/EGFP)23.2Spar/Mmjax heterocigotas (Dereg+) presentan un transgén BAC que contiene la secuencia génica para la expresión de una proteína de fusión entre el receptor de toxina diftérica símico y el eGFP (DTR-eGFP). Esta secuencia se encuentra bajo el control de regiones promotoras/enhancer de *Foxp3* endógeno, resultando en la co-expresión de Foxp3 y DTR-eGFP [210]. Esto permite la eliminación condicional de las células que expresan Foxp3 luego de la administración de toxina diftérica a estos animales, además de la fácil identificación de estas células mediante el eGFP. Los ratones se adquirieron en The Jackson Laboratory (EEUU; n° de stock MMRRC: 32050) y fueron mantenidos mediante la cruce de ratones WT con ratones Dereg+ en el Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra de la ciudad de Córdoba. Al momento de utilizarse, la progenie se trasladó al bioterio de nuestro Instituto y se fenotipificaron mediante citometría de flujo de sangre para la expresión de eGFP, siendo Dereg+ sistemáticamente el 50% de la misma. En los experimentos que se indica, se utilizaron los hermanos de camada Dereg- que no poseen el transgén. El fondo genético de estos animales es C57BL/6.

- **Ratones BALB/c:** animales de la cepa BALB/c fueron endocriados en nuestro Instituto a partir de progenitores provistos por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Para los experimentos llevados a cabo en este trabajo se utilizaron ratones hembras o machos de 7 a 10 semanas de edad, criados en un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas y alimentados *ad libitum*. Los animales se mantuvieron en el bioterio del Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET) con el número de aprobación del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH): A5802-01. Para su cuidado, se siguieron las recomendaciones de la guía para el cuidado y uso de animales de experimentación, publicada por el Consejo Canadiense de Protección de los Animales y aprobado por el Comité de Ética de Protocolos Experimentales en el uso de animales en los proyectos científicos de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (resoluciones HCD 274/09, 981/13 y 565/15).

## Parásitos y modelo de infección

### *Mantenimiento de la cepa Tulahuén de T. cruzi*

Los tripomastigotes de la cepa Tulahuén se mantuvieron a través de pase del parásito en ratones BALB/c machos de 7 a 9 semanas de edad. En cada pase, dos animales se infectaron intraperitonealmente con 0,5 a  $1 \times 10^6$  parásitos en PBS (Gibco). A los 10 u 11 días, la sangre de estos animales sirvió como fuente de tripomastigotes para sostener el pase e infectar los ratones necesarios para cada experimento.

### *Determinación de la parasitemia*

La sangre se obtuvo como se indica más adelante y se diluyó en un factor de 1/5, 1/10 ó 1/20 con una solución de cloruro de amonio al 0,87%. Inmediatamente luego de la lisis de los glóbulos rojos, se contaron los tripomastigotes móviles a través del recuento en cámara de Neubauer en un microscopio óptico.

### *Infección con T. cruzi*

Los ratones se infectaron de forma intraperitoneal con 5000 tripomastigotes de la cepa Tulahuén en PBS (Gibco) o solución fisiológica. La dosis de 5000 parásitos fue

seleccionada previamente por el grupo de investigación de manera de generar una infección sistémica, en la cual la mayoría de los ratones WT sobreviven la etapa aguda de la infección y progresan a la cronicidad [157]. En los experimentos donde se indica, se utilizaron dosis de 500, 50.000 y 100.000 parásitos.

### Métodos *ex vivo*

#### *Procesamiento de órganos y obtención de leucocitos*

Las muestras se obtuvieron de sangre, bazo, timo, GLI, GLM, hígado y médula ósea de los ratones. Para colectar la sangre, se penetró el seno venoso retro-orbital con una pipeta Pasteur de vidrio o se realizó un pequeño corte en la parte superior de la vena lateral de la cola utilizando un bisturí en animales vivos. En todos los casos, las muestras de sangre fueron heparinizadas para evitar su coagulación. Una vez realizado esto, en el caso de necesitarse las muestras de los diferentes órganos, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical e inmediatamente se prosiguió a la obtención de los órganos. En aquellos casos en que las células fueran a ser utilizadas en cultivos celulares se mantuvo la esterilidad de las muestras desde el momento de la extracción. A menos que se indique, todos los órganos se procesaron en solución fisiológica o PBS (Gibco) suplementados al 2% con SBF (Natocor o Gibco) inactivado por calor (PBS - 2% SBF) en frío. En general, los órganos sólidos se colocaron en placas conteniendo mallas metálicas y PBS - 2% SBF, y fueron disgregados mecánicamente utilizando émbolos para obtener así las suspensiones celulares. A continuación se detallan las particularidades del procesamiento de cada órgano.

Bazo: una vez obtenidas las suspensiones celulares de bazo, las mismas se centrifugaron durante 5 min a 2000 rpm a 4 °C. Los pellets se resuspendieron en buffer de lisis de glóbulos rojos a base de amoníaco-cloruro-potasio (Sigma o Gibco). Luego de 3 min, se adicionó PBS - 2% SBF en exceso para frenar el proceso de lisis y se centrifugaron en las mismas condiciones descriptas anteriormente. Las células se lavaron una vez con PBS - 2% SBF, se centrifugaron por 5 min a 2000 rpm a 4 °C, y se resuspendieron en esta misma solución.

Timo y ganglios: las suspensiones celulares se centrifugaron al igual que para bazo, se lavaron con PBS - 2% SBF extrayendo la mayor cantidad posible de residuos grasos, y se resuspendieron en esta misma solución. Particularmente, los GLM se procesaron utilizando medio RPMI completo (medio RPMI 1640 (Gibco), suplementado con 10% (v/v) de SBF inactivado por calor (Natocor), 55  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanol (Gibco), 2 mM glutamina (Gibco) y 40  $\mu$ g/mL gentamicina) con el fin de favorecer la supervivencia de las células.

Hígado: las suspensiones celulares se centrifugaron durante 5 min a 2000 rpm y se prosiguió a la obtención de leucocitos mediante gradiente de Percoll (GE Healthcare). Para ello, las células se resuspendieron en Percoll al 35% en RPMI 1640 (Gibco) y se depositaron sobre una capa de Percoll al 70% en PBS (Gibco). La bicapa se centrifugó durante 25 min a 600 g a temperatura ambiente, para obtener el infiltrado leucocitario en la interfase. Esta capa se recuperó y se lavó con PBS - 2% SBF en exceso. A continuación se lisaron los glóbulos rojos de igual manera que para el bazo, las células se lavaron nuevamente, y se resuspendieron en PBS - 2% SBF para su recuento.

Médula ósea: las células de médula ósea se obtuvieron de fémures y tibias libres de tejido muscular. Los extremos de estos huesos se cortaron y se extrajo la médula por lavados a presión moderada con PBS - 2% SBF utilizando una jeringa de tuberculina. Las suspensiones celulares se centrifugaron durante 5 min a 2000 rpm a 4 °C y se lisaron los glóbulos rojos de la misma forma que para bazo. Luego de la lisis, los leucocitos obtenidos se lavaron dos veces y se resuspendieron en PBS - 2% SBF para su recuento.

En todos los casos, el número de células obtenidas se cuantificó mediante recuento en cámara de Neubauer utilizando líquido de Turk (solución de violeta de genciana 0,01% con ácido acético glacial 2%).

#### *Determinaciones bioquímicas en sangre*

Los niveles de hemoglobina se evaluaron en sangre entera a través del método colorimétrico mediante el kit Hemocian-B (Brizuela-Lab) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y analizando la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro para placas

## Materiales y métodos

BIO-RAD. Para el análisis de las curvas de calibración y la extrapolación de los datos se utilizó el software GraphPad Prism.

El resto de las determinaciones se realizaron en plasma sanguíneo obtenido mediante centrifugación de la sangre heparinizada a 3000 rpm durante 8 minutos. Una fracción del plasma de cada muestra se envió a la empresa Biocon para las determinaciones según protocolos estándares, mientras que el resto del plasma obtenido se almacenó a -80 °C para su uso posterior. La empresa Biocon cuantificó los niveles de Glucosa por método enzimático/colorimétrico; LDH, GOT, GPT, y CPK por método Cinético-UV (37 °C); y CPK-MB por método enzimático, utilizando en todos los casos un analizador Dimension RXL Siemens.

### *Medición de citoquinas en plasma sanguíneo*

La concentración de citoquinas se determinó en plasma sanguíneo por citometría de flujo utilizando un sistema multiplex basado en perlas (kits LEGENDPlex Mouse Th Cytokine Panel y Mouse Inflammation Panel, Biolegend) para la medición simultánea de varias citoquinas de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo BD FACSCanto II. Los archivos que se generaron se analizaron de acuerdo a la intensidad de fluorescencia en el software FlowJo.

Alternativamente, en los casos indicados, IFN- $\gamma$  e IL-17A se cuantificaron mediante la técnica de ELISA a través del uso de kits comerciales en formato Ready-SET-Go! (eBioscience) siguiendo las especificaciones del fabricante. Además de los reactivos provistos por el kit, las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos high binding half area (Costar), se utilizó PBS-Tween 20 al 0,05 % para los lavados, y el reactivo TMB (BD Biosciences) fue utilizado para aportar el sustrato de la enzima y el cromógeno. La reacción se inactivó con ácido sulfúrico 2N y el color generado se midió según la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro para placas BIO-RAD.

En todos los casos, el análisis de las curvas de calibración y la extrapolación de la concentración se realizó utilizando el software GraphPad Prism.

### *Citometría de flujo*

**Marcación de moléculas de superficie:** 2 x 10<sup>6</sup> células de las suspensiones obtenidas para los diferentes órganos se incubaron durante 20 min a 4 °C en oscuridad con diversos



anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos. Para ello, el volumen de suspensión que contenía ese número de células se colocó en placas de 96 pocillos fondo en U o en tubos eppendorf, que se centrifugaron durante 5 min a 2000 rpm a 4 °C. Los botones celulares resultantes se resuspendieron a continuación con 20 µL de la dilución mezcla de los anticuerpos requeridos a la concentración adecuada en PBS - 2% SBF. Los anticuerpos señalados en la tabla 4 se utilizaron en diferentes combinaciones según fue necesario en cada experimento. En el caso de utilizar anticuerpos biotinilados, su detección incluyó una incubación adicional con estreptavidina marcada fluorescentemente (tabla 4). Cuando la tinción implicó la identificación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para *T. cruzi*, se adicionó un paso previo de incubación con un tetrámero de moléculas H2-K<sup>b</sup> cargadas con el péptido TSKB20 (ANYKFTLV, aminoácidos 569 a 576 de la enzima transialidasa de *T. cruzi*), conjugado con el fluorocromo APC (NIH Tetramer Core Facility, Emory University, EEUU). Una vez transcurrido el tiempo de incubación indicado, las células se lavaron con PBS - 2% SBF en exceso y se resuspendieron en 100 µL de esta misma solución para ser adquiridas en el citómetro de flujo en un tiempo no mayor a 24 hs.

En el caso particular de la tinción de células de sangre, 50 a 100 µL de la muestra de sangre entera heparinizada se incubaron con 20 µL de la dilución mezcla de los anticuerpos a la concentración adecuada en PBS - 2% SBF durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, se adicionó 500 a 1000 µL de buffer de lisis de glóbulos rojos y las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo en un tiempo que no superó los 30 min.

Determinación de células en apoptosis: luego de la tinción de moléculas de superficie, las células se marcaron con 7-AAD (BD Pharmigen) y Anexina V conjugada con PE (Biolegend) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las células se resuspendieron en el buffer indicado por el fabricante para ser adquiridas en el citómetro de flujo en un tiempo no mayor a 30 min.

Detección de factores de transcripción: luego de la marcación de moléculas de superficie, las células se fijaron y permeabilizaron utilizando el kit Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez permeabilizadas, las

células se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad con 20  $\mu$ L de la dilución adecuada de los anticuerpos monoclonales en el buffer de permeabilización provisto por el kit. En la tabla 4 se señalan las características de los anticuerpos utilizados. Pasado el tiempo de incubación, las células se lavaron en el buffer de permeabilización y se resuspendieron en 100  $\mu$ L de esta misma solución para ser adquiridas en el citómetro de flujo hasta 24 hs después de la tinción.

DetECCIÓN DE citoquinas intracelulares: 2 x 10<sup>6</sup> células de las suspensiones de bazo se estimularon *in vitro* durante 2 hs a 37 °C en medio RPMI completo adicionado con 50 ng/mL PMA (Sigma) y 1  $\mu$ g/mL ionomicina (Sigma) en presencia de Brefeldina A y/o Monensina (inhibidores del transporte vesicular, eBioscience). Una vez transcurrido ese tiempo, las células se lavaron con PBS - 2% SBF y se prosiguió a la tinción de moléculas de superficie. A continuación, las células se fijaron y permeabilizaron con el kit Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (eBioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la tinción de citoquinas, las células permeabilizadas se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad con 20  $\mu$ L de la dilución adecuada de los anticuerpos monoclonales (tabla 4) en el buffer de permeabilización provisto por el kit. Una vez transcurridos 30 min en estas condiciones, las células se lavaron con dicho buffer de permeabilización y se resuspendieron en 100  $\mu$ L de esta misma solución para ser adquiridas en el citómetro de flujo en un tiempo no mayor a 24 hs.

Análisis funcional de linfocitos T CD8<sup>+</sup>: se evaluó la movilización de CD107a a la superficie celular y la producción de las citoquinas IFN- $\gamma$  y TNF, en respuesta a un péptido específico del parásito (TSKB20) y a mitógenos (PMA/Ionomicina) en esplenocitos de ratones infectados. CD107a es una molécula que se expresa en la membrana del compartimiento endosomal/lisosomal, y que puede detectarse en la superficie celular de manera transitoria luego del proceso de degranulación. Para ello, 2 x 10<sup>6</sup> esplenocitos se cultivaron *in vitro* a 37 °C en medio RPMI completo en presencia del anticuerpo monoclonal anti-CD07a, de Brefeldina A y de Monensina (inhibidores del transporte vesicular, eBioscience) desde el inicio del cultivo. Las células se estimularon con el agregado de 5  $\mu$ g/mL del péptido TSKB20 (Genscript Inc.). Los controles positivos se estimularon con 50 ng/mL PMA (Sigma) y 1  $\mu$ g/mL ionomicina (Sigma), mientras que los

controles negativos no recibieron estímulo alguno. Luego de 5 hs en estas condiciones, las células se lavaron con PBS - 2% SBF y se prosiguió a la tinción de moléculas de superficie. A continuación, las células se fijaron y permeabilizaron con el kit BD Cytofix/Cytoperm and Perm/Wash (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la tinción de citoquinas, las células permeabilizadas se incubaron al igual que anteriormente a temperatura ambiente en oscuridad con 20  $\mu$ L de la dilución adecuada de los anticuerpos monoclonales (tabla 4) en el buffer de permeabilización provisto por el kit. Una vez transcurridos 30 min en estas condiciones, las células se lavaron con dicho buffer de permeabilización y se resuspendieron en 100  $\mu$ L de esta misma solución para ser adquiridas en el citómetro de flujo en un tiempo no mayor a 24 hs.

Todas las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo BD FACSCanto II de acuerdo a protocolos convencionales. Los datos generados se analizaron mediante el software FlowJo, incluyendo en todos los casos un primer paso de selección de células vivas de acuerdo al tamaño y granularidad según FSC-A vs SSC-A, o según la marcación con 7-AAD (7-AAD<sup>-</sup>), y un segundo paso de exclusión de dobletes.

Especificidad	Clon	Fluorocromo	Marca comercial
anti-CCR7	4B2	PerCP-Cy5.5	eBioscience
anti-CD103	2-E7	PE	eBioscience
anti-CD107a	1D4B	PE	Biolegend
anti-CD127	B12-1, eBioSB/199	Biotina, PerCP-eFluor-710	BD Biosciences, eBioscience
anti-CD19	eBio1D3	APC-Cy7	eBioscience
anti-CD25	P61.5	PE-Cy7	eBioscience
anti-CD3e	145-2C11	PerCP-Cy5.5	eBioscience
anti-CD39	24DMS1	eFluor-660	eBioscience
anti-CD4	GK1.5	AlexaFluor700, APC, APC-eFluor-780, FITC, PerCP-eFluor 710	Biolegend, eBioscience
anti-CD44	IM7	APC-Cy7	eBioscience
anti-CD45.1	A20	APC-Cy7	Biolegend
anti-CD45.2	104	PerCP-Cy5.5	eBioscience
anti-CD62L	MEL-14	PerCP-Cy5.5	eBioscience
anti-CD73	eBioTY/11-8	Biotina	eBioscience
anti-CD8a	53-6.7	FITC, PE, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5	eBioscience
anti-CTLA-4	UC10.4B9	PE	eBioscience
anti-CXCR3	CXCR3-173	PE	eBioscience
anti-FR4	eBio12a5	PE	eBioscience
anti-GARP	YGIC86	APC	eBioscience
anti-GITR	DTA-1	PE-Cy7	Biolegend
anti-KLRG1	2F1/KLRG	PE	Biolegend
anti-LAG-3	C9B7W	PerCP-Cy5.5	Biolegend
anti-LAP	TW7-20B9	PE	Biolegend
anti-OX40	OX-86	APC	eBioscience
anti-PD-1	RMP1-30	PE	eBioscience
Estreptavidina	-	APC, PerCP-Cy5.5	Biolegend, eBioscience
anti-Foxp3	FJK-16s	PE, PerCP-Cy5.5, APC	eBioscience
anti-Helios	22F6	APC	eBioscience
anti-Ki-67	SolA15	APC	eBioscience
anti-Nrp1	3E12	PerCP-Cy5.5	Biolegend
anti-T-bet	eBio4B10	PerCP-Cy5.5, PE-Cy7	eBioscience
anti-IFN- $\gamma$	XMG1.2	APC, PE	eBioscience
anti-IL-10	JES5-16E3	APC, PE	eBioscience
anti-IL-17A	eBio17B7	PE	eBioscience
anti-TNF- $\alpha$	MP6-XT22	PerCP-Cy5.5	Biolegend

**Tabla 4: Características de los anticuerpos monoclonales para ratón utilizados en citometría de flujo.**

La concentración a utilizar de todos los anticuerpos se puso a prueba en instancias previas a los experimentos que se muestran en este trabajo.

*Purificación de células*

Para la purificación de distintas subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup> (células Treg: CD4<sup>+</sup> Foxp3-GFP<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, Tconv: CD4<sup>+</sup> Foxp3-GFP<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup>, y T CD4<sup>+</sup> vírgenes: CD4<sup>+</sup> Foxp3-GFP<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup>), las suspensiones celulares de bazo se enriquecieron en linfocitos T CD4<sup>+</sup> a través de la selección negativa con perlas magnéticas EasySep (Mouse CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit, StemCell) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las células recuperadas se lavaron con buffer MACS (PBS (Gibco) suplementado con 2 mM EDTA (Gibco) y 0,5 % SBF (Gibco) inactivado por calor y filtrado a través de una membrana de 0,22 µm), y se resuspendieron en 200 µL de este mismo buffer. Esta suspensión enriquecida en linfocitos T CD4<sup>+</sup> fue teñida con los anticuerpos monoclonales requeridos para la purificación posterior mediante “cell sorting”. Luego de una tinción de 10 min a 4 °C en oscuridad, las células se lavaron con buffer MACS en exceso, se resuspendieron en esta misma solución, y se filtraron utilizando un Cell strainer de 0,4 µm (Falcon Corning Brand). Inmediatamente, se prosiguió a la separación de las subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup> de interés mediante “cell sorting” en un equipo BD FACSAria II. Las células purificadas se colectaron en tubos estériles conteniendo 2 a 4 mL de medio RPMI completo con concentración doble de SBF y gentamicina (medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 20% (v/v) de SBF inactivado por calor, 55 µM β-mercaptoetanol (Gibco), 2 mM glutamina (Gibco) y 80 µg/mL gentamicina). La pureza de estas células se evaluó en el mismo equipo BD FACSAria II (post-sort). Las células recuperadas se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min, se resuspendieron en medio RPMI completo con concentración doble de gentamicina, y se dejaron reposar 30 min a 37 °C en estufa de cultivo celular.

Por otra parte, la purificación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> se realizó mediante selección negativa con perlas magnéticas EasySep (Mouse CD8<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit, StemCell) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de las células recuperadas fue evaluada por citometría de flujo con marcación de superficie.

En todos los casos, las purificaciones se realizaron manteniendo las condiciones de esterilidad. Además, el recuento de las células purificadas viables se realizó en cámara de Neubauer utilizando una solución del colorante vital Azul de Tripán (Gibco) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

## Cultivos celulares *in vitro*

### *Ensayos de supresión in vitro*

Células Treg, Tconv y T CD8<sup>+</sup> se purificaron como se describe previamente a partir de bazos de ratones Foxp3-GFP infectados o no, según se indica para cada experimento en particular en la sección de resultados. Las células Tconv y T CD8<sup>+</sup> se utilizaron como células respondedoras, para lo cual se tiñeron con el colorante Cell Proliferation Dye eFluor 670 (eBioscience) que permite monitorear la proliferación luego de hasta 6 rondas de división celular mediante citometría de flujo. La tinción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, y las células se dejaron reposar 30 min a 37 °C en estufa de cultivo celular. Luego de la tinción, las células viables se contaron en cámara de Neubauer utilizando una solución del colorante vital Azul de Tripán. Además, el éxito de la tinción con Cell Proliferation Dye eFluor 670 se verificó mediante citometría de flujo. A continuación, las células respondedoras teñidas se co-cultivaron en diferentes relaciones con las células Treg, utilizando siempre  $1 \times 10^5$  células respondedoras vivas y variando el número de células Treg que se agregó a cada pocillo. Como control de la proliferación máxima se dejaron pocillos con células respondedoras pero sin el agregado de células Treg. Las células se cultivaron en medio RPMI completo con concentración doble de gentamicina en placas de 96 pocillos fondo plano estériles que habían sido sensibilizadas el día previo con 0,5 a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anti-CD3 (eBioscience) y 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anti-CD28 (BD Biosciences) como estímulos policlonales de sobrevida. Luego de cuatro días en estufa de cultivo a 37 °C y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %, se analizó mediante citometría de flujo la dilución del colorante en las células respondedoras, así como también la producción de IFN- $\gamma$  en los casos donde se indica.

### *Diferenciación de células iTreg*

Según se indica en la sección de resultados, esplenocitos totales, células T CD4<sup>+</sup> vírgenes o células Tconv se purificaron de bazos de ratones Foxp3-GFP. Estas células se resuspendieron en medio RPMI completo y se colocaron en placas de 96 pocillos fondo plano estériles que habían sido sensibilizadas el día previo con 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anti-CD3 (eBioscience) y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anti-CD28 (BD Biosciences) para el estímulo policlonal de sobrevida de linfocitos. En cada pocillo se colocaron  $1-2 \times 10^5$  células. Como estímulo para

la polarización hacia Treg, se agregó además medio RPMI completo adicionado con 100 U/mL rIL-2, 5 ng/mL mrTGF- $\beta$  (eBioscience) y la cantidad de atRA (Sigma) indicada en cada caso. Las células se cultivaron en estas condiciones en estufa de cultivo a 37 °C y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % durante cuatro días. En este momento, se verificó la ausencia de contaminación del cultivo usando un microscopio óptico para placas, y se evaluó mediante citometría de flujo el porcentaje de células iTreg obtenido, además de la producción de IFN- $\gamma$ , IL-17A e IL-10, y el nivel de expresión de Foxp3 y CD25 cuando se indica.

Para el análisis de la estabilidad y la función supresora, las células iTreg se diferenciaron *in vitro* como se explica arriba. Al cuarto día de cultivo, las células obtenidas se colectaron y se lavaron con buffer MACS, y se purificaron por “cell sorting” las células Foxp3-GFP<sup>+</sup> generadas (iTreg) como se explicó previamente. Una fracción de las células iTreg se utilizó para el estudio de la estabilidad y otra para llevar a cabo un ensayo de supresión de la proliferación *in vitro*. En el primer caso, las células iTreg se cultivaron en placas de 96 pocillos sensibilizadas con las concentraciones indicadas arriba de anti-CD3 y anti-CD28 pero en ausencia de IL-2, TGF- $\beta$  y atRA. Al cuarto día de cultivo, se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de células iTreg obtenido, su producción de IFN- $\gamma$  e IL-17A, y el nivel de expresión de Foxp3 y CD25. En el caso del estudio funcional, las células iTreg se co-cultivaron con diferentes relaciones de células Tconv purificadas de animales Foxp3-GFP no infectados y teñidas con el colorante Cell Proliferation Dye eFluor 670 (eBioscience). Al igual que en los ensayos de supresión previos, el cultivo se realizó en placa de 96 pocillos fondo plano sensibilizada con 1  $\mu$ g/mL de anti-CD3 y 0,2  $\mu$ g/mL de anti-CD28, y luego de cuatro días se evaluó mediante citometría de flujo la dilución del colorante en las células respondedoras.

## Tratamientos *in vivo*

### *Transferencias adoptivas*

Para el estudio de la generación de células pTreg, 2 x 10<sup>6</sup> células Tconv se purificaron de bazo de ratones Foxp3-GFP CD45.2, se resuspendieron en PBS (Gibco) y se inyectaron por vía endovenosa retro-orbital en ratones WT CD45.1. Los animales fueron

## Materiales y métodos

infectados con 5000 tripomastigotes de *T. cruzi* inmediatamente luego de la transferencia. Como control, algunos animales no se infectaron.

En los experimentos de transferencia adoptiva de células Treg,  $0,5-1 \times 10^6$  células iTreg se diferenciaron *in vitro* a partir de células Tconv purificadas de bazos de animales Foxp3-GFP CD45.2. Las células obtenidas se resuspendieron en PBS (Gibco) y se inyectaron por vía endovenosa retro-orbital en ratones WT CD45.1 al d11pi o en controles no infectados.

### *Administración de atRA*

Ratones Foxp3-GFP infectados o controles sin infectar fueron inyectados con 250µg atRA (Sigma) en DMSO (Sigma) administrado en forma intraperitoneal. A lo largo del tratamiento se realizaron 4 a 5 inyecciones día por medio. Además, como controles se incluyeron animales tratados solo con el vehículo DMSO que fueron inyectados al mismo tiempo que los ratones que recibieron atRA, o animales que no recibieron ningún tratamiento. Todos los animales fueron sacrificados entre los días 16 y 19 pi según cada experimento particular.

### *Eliminación de células Treg*

Ratones DREG+ y DREG- recibieron en forma intraperitoneal la dosis indicada de DT (Calbiochem) diluída en PBS (Gibco), o PBS como control. El tratamiento en animales control sin infectar o ratones infectados al dpi que se indica en la sección de resultados consistió en dos inyecciones, una por día en días consecutivos. Los animales se sacrificaron 24 a 48 hs luego del tratamiento, o en diferentes dpi según se muestra en cada figura. Cuando los animales fueron sacrificados luego de 48 hs posteriores al tratamiento, se monitoreó a diferentes dpi la eliminación eficiente de células Treg en sangre de ratones DREG+ mediante citometría de flujo. En estos casos, la muestra de sangre se utilizó también para determinar la parasitemia y las frecuencias de otras poblaciones celulares.



## Métodos de biología molecular

### *RNAseq*

Medio millón de células Treg se purificaron de bazos de ratones Foxp3-GFP no infectados o luego de 22 días de la infección con *T. cruzi*, se lavaron dos veces con PBS (Gibco) a fin de eliminar el medio de cultivo, y se lisaron a través de su resuspensión y vortexeado en 700  $\mu$ L en QIAzol (Qiagen). El procedimiento se realizó para triplicados biológicos de cada grupo. Estas muestras se congelaron inmediatamente a través de la inmersión en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80$  °C hasta su envío a nuestros colaboradores en Francia. El ARN total de las muestras lisadas se extrajo mediante miRNeasy Micro Kit (Qiagen), incluyendo un paso de tratamiento con DNAsa I. El ARN obtenido se cuantificó mediante un equipo Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen) y su calidad se evaluó con un equipo Agilent 2100 BioAnalyzer. Luego, se prepararon librerías para RNAseq de acuerdo al protocolo TruSeq Stranded Total RNA Sample (Illumina). Este procedimiento implicó la eliminación de los ARNr y ARNmit, la síntesis de ADNc a partir de las moléculas de ARN restantes, la adición de adaptadores necesarios para el proceso de secuenciación posterior, y por último, la amplificación de estas moléculas, utilizando un termociclador Mastercycler nexus gradient (Eppendorf). La calidad de las librerías generadas se determinó nuevamente con un bioanalizador Agilent 2100. Por último, las muestras fueron indexadas y secuenciadas utilizando un equipo Illumina HiSeq 3000.

El análisis bioinformático de los “Reads” o lecturas secuenciadas incluyó la remoción de las bases de baja calidad y el corte de los adaptadores con las herramientas FastQC y Cutadapt, respectivamente. A continuación, los Reads de alta calidad se alinearon al genoma de referencia de ratón mm10 con el software TopHat, y los Reads así alineados a los genes se contaron utilizando la herramienta HTSeq Count. Por último, la expresión diferencial se analizó con el paquete DESeq del software Bioconductor. Los genes con un valor  $p$  ajustado  $<0,1$  (el valor  $p$  se ajustó para múltiples pruebas con el procedimiento de Benjamini–Hochberg) se setearon como el punto de corte para genes con expresión diferencial significativa en la población de células Treg del d22pi respecto a su expresión en células Treg de animales no infectados.

### *Determinación del parasitismo tisular*

La cuantificación de los niveles de parásitos en tejidos (bazo, hígado y corazón) se realizó mediante PCR del ADN satelital de *T. cruzi*. Para ello, en un primer momento se llevó a cabo la extracción de ADN de estos órganos, para luego cuantificar el ADN de *T. cruzi* presente en las muestras mediante PCR en tiempo real. En este sentido, el ADN se extrajo a partir una pequeña sección de los órganos de animales infectados, que se almacenó a -80 °C hasta su uso. Al momento de extraer el ADN, las muestras se descongelaron y se homogeneizaron utilizando TRIzol (Life Technologies), siguiendo el protocolo de extracción de ADN provisto por el fabricante. Brevemente, este procedimiento incluyó una etapa de separación de fases por el agregado de cloroformo (Dorwil), con recuperación de la fase orgánica y la interfase, y la precipitación subsiguiente del ADN a través de la adición de etanol absoluto. El ADN precipitado se lavó con la solución indicada de citrato de sodio / etanol (0,1 M citrato de sodio en etanol 10% (etanol absoluto en agua Ultra Pure (Invitrogen), pH 8,5) y luego con etanol 75% (etanol absoluto en agua Ultra Pure). Finalmente, el ADN precipitado se resuspendió en 8 mM NaOH, ajustando el pH a 8 con 0,1 M HEPES – 1 mM EDTA (Gibco). La concentración del ADN así obtenido se midió por espectrofotometría según la absorbancia a 260 nm utilizando un equipo BIO TEK microplate spectrophotometer (Bio Tek Instruments, Inc.). Las muestras de ADN se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

La PCR en tiempo real se llevó a cabo utilizando sondas Taqman (Applied Biosystems). En este caso, la secuencia de los cebadores y las sondas fue personalizada para hibridar con la región del ADN satélite de *T. cruzi* (GenBank AY520036), como se reportó previamente [251]. Además, como control endógeno se utilizaron primers/sondas para GAPDH (Taqman Rodent GAPDH control Reagent, Applied Biosystems). Todas las sondas utilizadas se caracterizaron por estar conjugadas a FAM como reportero fluorescente y a TAMRA como quencher. La determinación se realizó en una muestra conjunto o “pool” conformada por muestras de ADN de entre 2 a 5 animales mezcladas proporcionalmente a fin de alcanzar los 2 µg de ADN total por reacción de PCR a realizar. El ADN de los “pools”, los cebadores/sondas adecuados y el “buffer” de reacción (TaqMan Universal Master Mix II, no UNG, Applied Biosystems) conteniendo los dNTPs y la enzima ADN polimerasa AmpliTaq Gold, se colocaron en placas de 96 pocillos a un volumen final de reacción de 15 µL. Las reacciones, tanto para los cebadores/sondas de *T.*

*cruzi* como para los de GAPDH, se llevaron a cabo por triplicado. Se utilizó un termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), de acuerdo a las instrucciones del fabricante para el uso de sondas Taqman, con 45 ciclos de amplificación.

Los resultados se analizaron utilizando el software StepOne y la hoja de cálculos Excel, mediante el método comparativo por cálculo del  $\delta\delta C_T$ . Para ello, el ciclo de amplificación en el cual la fluorescencia atravesó el umbral ( $C_T$ ) se promedió entre los triplicados. Luego, la cantidad de ADN de parásito se normalizó a la del gen GAPDH endógeno, al calcular para cada muestra el  $\delta C_T = C_T T. cruzi - C_T GAPDH$ . A continuación, se determinó la diferencia entre el  $\delta C_T$  para el grupo tratado y el grupo control de cada experimento ( $\delta\delta C_T$ ), y finalmente, se utilizó la fórmula  $\text{fold change} = 2^{-\delta\delta C_T}$  para calcular la cantidad relativa de ADN satélite de *T. cruzi* presente en las muestras del grupo tratado respecto a las del grupo control.

### Correlaciones, análisis estadístico y generación de gráficos

El estudio de correlaciones se realizó mediante el método de Spearman, que cuantifica la asociación según una función monótona<sup>1</sup>, ya sea lineal o no. Así, la intensidad o grado de asociación está dado por el coeficiente  $r$  de Spearman, un índice del ajuste de los puntos a la curva. El signo de este coeficiente indica si la asociación es directa ( $r > 0$ , signo positivo, al aumentar una de las variables aumenta también la otra) o inversa ( $r < 0$ , signo negativo, al aumentar una de las variables disminuye la otra), mientras que su valor absoluto o magnitud es una medida de la fuerza de asociación entre las dos variables, pudiendo tomar valores entre -1 y +1. Si  $|r| < 0,30$  hablaremos de una asociación débil, mientras que  $0,30 \leq |r| \leq 0,70$  indica una asociación moderada, y  $|r| > 0,70$  define una asociación fuerte. Por el contrario, un valor  $r = 0$  indica que no existe correlación [252].

A menos que se indique lo contrario, el análisis de correlaciones y los procedimientos estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 7.0. Estos últimos se llevaron a cabo mediante pruebas de hipótesis nula para la comparación de medias entre grupos, verificando la distribución normal de los datos y la

---

<sup>1</sup> Una función monótona es aquella enteramente no-creciente o bien enteramente no-decreciente.

homogeneidad de las desviaciones estándar cuando fuera necesario. El tipo de comparaciones realizadas dependió de cada diseño experimental, utilizándose alguna de las siguientes pruebas: t-test, ANOVA de una vía, ANOVA de dos vías o test de Kruskal-Wallis. El test utilizado en cada caso, las comparaciones múltiples post-test, y el valor de probabilidad (valor p) que resulta de cada prueba de hipótesis nula se indica en los gráficos. Los valores  $p < 0,05$  se consieraron significativos. En el caso de no resultar significativos, estos valores se indicaron solo cuando  $p < 0,1$ .

Los gráficos de barras y las distribuciones X vs Y también se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 7.0, representándose como promedio o promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM) según se indica en cada caso. Para los gráficos de barra, se representa además el valor obtenido para cada animal mediante un círculo superpuesto a la barra. En cuanto a los gráficos de citometría de flujo, se exportaron del software FlowJo luego del análisis. Por último, el gráfico de componentes principales, el gráfico de estrella y los gráficos “heat map” se obtuvieron luego del procesamiento de los datos en el software InfoStat, la hoja de cálculos Excel y la herramienta en línea Matrix2png, respectivamente.

# BIBLIOGRAFÍA



1. Coura, J.R. and P.A. Vinas, *Chagas disease: a new worldwide challenge*. Nature, 2010. **465**(7301): p. S6-7.
2. Bern, C., *Chagas' Disease*. New England Journal of Medicine, 2015. **373**(5): p. 456-466.
3. Gascon, J., et al., *[Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where Trypanosoma cruzi infection is not endemic]*. Rev Esp Cardiol, 2007. **60**(3): p. 285-93.
4. Sanchez, L.V. and J.D. Ramirez, *Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects*. Parasitology, 2013. **140**(2): p. 147-59.
5. Rassi, A., Jr., A. Rassi, and J.A. Marin-Neto, *Chagas disease*. Lancet, 2010. **375**(9723): p. 1388-402.
6. Coura, J.R. and J. Borges-Pereira, *Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review*. Acta Trop, 2010. **115**(1-2): p. 5-13.
7. Junqueira, C., et al., *The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease*. Expert Rev Mol Med, 2010. **12**: p. e29.
8. Dutra, W.O., et al., *Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104 Suppl 1**: p. 208-18.
9. Perez-Molina, J.A. and I. Molina, *Chagas disease*. Lancet, 2017. **391**(10115): p. 82-94.
10. Rassi, A., Jr., A. Rassi, and W.C. Little, *Chagas' heart disease*. Clin Cardiol, 2000. **23**(12): p. 883-9.
11. Rassi, A., Jr., A. Rassi, and J. Marcondes de Rezende, *American trypanosomiasis (Chagas disease)*. Infect Dis Clin North Am, 2012. **26**(2): p. 275-91.
12. Burgos, J.M., et al., *Molecular identification of Trypanosoma cruzi discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation*. Clin Infect Dis, 2010. **51**(5): p. 485-95.
13. Machado, F.S., et al., *Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease*. Semin Immunopathol, 2012. **34**(6): p. 753-70.
14. Jones, E.M., et al., *Amplification of a Trypanosoma cruzi DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy*. Am J Trop Med Hyg, 1993. **48**(3): p. 348-57.
15. Vago, A.R., et al., *PCR detection of Trypanosoma cruzi DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease*. Lancet, 1996. **348**(9031): p. 891-2.
16. Rassi, A., Jr., J.A.N. Marin, and A. Rassi, *Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2017. **112**(3): p. 224-235.
17. Dutra, W.O., et al., *Immunoregulatory networks in human Chagas disease*. Parasite Immunol, 2014. **36**(8): p. 377-87.
18. Mengel, J., F. Cardillo, and L. Pontes-de-Carvalho, *Chronic Chagas' Disease: Targeting the Interleukin-2 Axis and Regulatory T Cells in a Condition for Which There Is No Treatment*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 675.

19. Girones, N., H. Cuervo, and M. Fresno, *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005. **296**: p. 89-123.
20. Cunha-Neto, E., et al., *Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry*. *Autoimmunity*, 2006. **39**(1): p. 41-54.
21. Zingales, B., *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop*, 2017.
22. Koga, R., et al., *TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 2006. **177**(10): p. 7059-66.
23. Campos, M.A., et al., *Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite*. *J Immunol*, 2001. **167**(1): p. 416-23.
24. Bafica, A., et al., *Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection*. *J Immunol*, 2006. **177**(6): p. 3515-9.
25. Ouaisi, A., et al., *The Trypanosoma cruzi Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection*. *J Immunol*, 2002. **168**(12): p. 6366-74.
26. Oliveira, A.C., et al., *Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to Trypanosoma cruzi glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with T. cruzi*. *J Immunol*, 2004. **173**(9): p. 5688-96.
27. Caetano, B.C., et al., *Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 2011. **187**(4): p. 1903-11.
28. Knubel, C.P., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for host resistance against Trypanosoma cruzi*. *FASEB J*, 2010. **24**(8): p. 2689-701.
29. Boscardin, S.B., et al., *Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies*. *J Cell Mol Med*, 2010. **14**(6B): p. 1373-84.
30. Rodrigues, M.M., A.C. Oliveira, and M. Bellio, *The Immune Response to Trypanosoma cruzi: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development*. *J Parasitol Res*, 2012. **2012**: p. 507874.
31. Martin, D. and R. Tarleton, *Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection*. *Immunol Rev*, 2004. **201**: p. 304-317.
32. Martin, D., et al., *CD8+ T-Cell responses to Trypanosoma cruzi are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes*. *PLoS Pathog*, 2006. **2**(8).
33. Tarleton, R.L., *Immune system recognition of Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol*, 2007. **19**(4): p. 430-4.
34. Tarleton, R.L., *CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection*. *Semin Immunopathol*, 2015. **37**(3): p. 233-8.
35. Padilla, A., J. Bustamante, and R. Tarleton, *CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection*. *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(4): p. 385-390.
36. Jordan, K. and C. Hunter, *Regulation of CD8+ T cell responses to infection with parasitic protozoa*. *Experimental parasitology*, 2010. **126**(3): p. 318-325.
37. Vasconcelos, J.R., et al., *Relevance of long-lived CD8(+) T effector memory cells for protective immunity elicited by heterologous prime-boost vaccination*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 358.



38. Sepulveda, P., et al., *Modulation of cardiocyte functional activity by antibodies against trypanosoma cruzi ribosomal P2 protein C terminus*. Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 5114-9.
39. Bermejo, D.A., et al., *Trypanosoma cruzi infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies*. Immunology, 2011. **132**(1): p. 123-33.
40. Hoft, D.F., et al., *Trans-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic trypanosoma cruzi immunity involving CD8+ CTL and B cell-mediated cross-priming*. J Immunol, 2007. **179**(10): p. 6889-900.
41. Cardillo, F., et al., *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, 2007. **122**(4): p. 584-95.
42. Abel, L.C., et al., *Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to Trypanosoma cruzi infection*. J Autoimmun, 2001. **17**(1): p. 99-107.
43. Gomes, J.A., et al., *Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response*. Infect Immun, 2003. **71**(3): p. 1185-93.
44. Souza, P.E., et al., *Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity*. Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 5283-91.
45. Gomes, J.A., et al., *Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 7960-6.
46. Fiuza, J.A., et al., *Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human chagas disease*. PLoS Negl Trop Dis, 2009. **3**(9): p. e512.
47. Araujo, F.F., et al., *Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 2797-806.
48. Vitelli-Avelar, D.M., et al., *Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes*. Scand J Immunol, 2005. **62**(3): p. 297-308.
49. Rassi, A., et al., *[The influence of corticoids, in Chronic Chagas disease, administered in virtue of associated disorders]*. Rev Soc Bras Med Trop, 1997. **30**(2): p. 93-9.
50. Sartori, A.M., et al., *Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS*. Ann Trop Med Parasitol, 2007. **101**(1): p. 31-50.
51. Hunter, C.A., et al., *IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with Trypanosoma cruzi*. J Immunol, 1997. **158**(7): p. 3311-6.
52. Holscher, C., et al., *Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in Trypanosoma cruzi-infected interleukin 10-deficient mice*. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 4075-83.
53. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
54. Fontenot, J.D., et al., *Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 329-41.

55. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 68-73.
56. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 20-1.
57. Wildin, R.S., et al., *X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 18-20.
58. Ehrenstein, M.R., et al., *Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy*. J Exp Med, 2004. **200**(3): p. 277-85.
59. Viglietta, V., et al., *Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis*. J Exp Med, 2004. **199**(7): p. 971-9.
60. Lindley, S., et al., *Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 92-9.
61. Horwitz, D.A., *Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(6): p. 227.
62. Zenclussen, A.C., *Regulatory T cells in pregnancy*. Springer Semin Immunopathol, 2006. **28**(1): p. 31-9.
63. Curotto de Lafaille, M.A., et al., *Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation*. Immunity, 2008. **29**(1): p. 114-26.
64. Izcue, A., J.L. Coombes, and F. Powrie, *Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 256-71.
65. Joffre, O., et al., *Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes*. Nat Med, 2008. **14**(1): p. 88-92.
66. Nadig, S.N., et al., *In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells*. Nat Med, 2010. **16**(7): p. 809-13.
67. Beyer, M. and J.L. Schultze, *Regulatory T cells in cancer*. Blood, 2006. **108**(3): p. 804-11.
68. Nishikawa, H. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in cancer immunotherapy*. Curr Opin Immunol, 2014. **27**: p. 1-7.
69. Boer, M.C., S.A. Joosten, and T.H. Ottenhoff, *Regulatory T-Cells at the Interface between Human Host and Pathogens in Infectious Diseases and Vaccination*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 217.
70. Rubtsov, Y.P., et al., *Stability of the regulatory T cell lineage in vivo*. Science, 2010. **329**(5999): p. 1667-71.
71. Miyao, T., et al., *Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells*. Immunity, 2012. **36**(2): p. 262-75.
72. Josefowicz, S.Z., L.F. Lu, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 531-64.
73. Sawant, D.V. and D.A.A. Vignali, *Once a Treg, always a Treg?* Immunol Rev, 2014. **259**(1): p. 173-191.
74. Josefowicz, S.Z. and A. Rudensky, *Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 616-25.

75. Morikawa, H. and S. Sakaguchi, *Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells*. *Immunol Rev*, 2014. **259**(1): p. 192-205.
76. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?* *Immunity*, 2009. **30**(5): p. 626-35.
77. Arpaia, N., et al., *Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation*. *Nature*, 2013. **504**(7480): p. 451-5.
78. Lu, L., J. Barbi, and F. Pan, *The regulation of immune tolerance by FOXP3*. *Nat Rev Immunol*, 2017. **17**(11): p. 703-717.
79. Thornton, A.M., et al., *Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells*. *J Immunol*, 2010. **184**(7): p. 3433-41.
80. Weiss, J.M., et al., *Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells*. *J Exp Med*, 2012. **209**(10): p. 1723-42, S1.
81. Yadav, M., et al., *Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo*. *J Exp Med*, 2012. **209**(10): p. 1713-22, S1-19.
82. Gottschalk, R.A., E. Corse, and J.P. Allison, *Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells*. *J Immunol*, 2012. **188**(3): p. 976-80.
83. Zabransky, D.J., et al., *Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells*. *PLoS ONE*, 2012. **7**(3): p. e34547.
84. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(7): p. 523-32.
85. Shevach, E.M., *Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression*. *Immunity*, 2009. **30**(5): p. 636-45.
86. Levine, A.G., et al., *Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(11): p. 1070-8.
87. Li, M.O. and A.Y. Rudensky, *T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function*. *Nat Rev Immunol*, 2016. **16**(4): p. 220-33.
88. Belkaid, Y., *Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(11): p. 875-88.
89. Huehn, J., et al., *Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells*. *J Exp Med*, 2004. **199**(3): p. 303-13.
90. Wang, R., et al., *Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(32): p. 13439-44.
91. Tomura, M., et al., *Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(3): p. 883-93.
92. Schoenbrunn, A., et al., *A converse 4-1BB and CD40 ligand expression pattern delineates activated regulatory T cells (Treg) and conventional T cells enabling direct isolation of alloantigen-reactive natural Foxp3+ Treg*. *J Immunol*, 2012. **189**(12): p. 5985-94.
93. Arvey, A., et al., *Inflammation-induced repression of chromatin bound by the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(6): p. 580-587.

94. Siegmund, K., et al., *Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo*. Blood, 2005. **106**(9): p. 3097-104.
95. Lee, J.H., S.G. Kang, and C.H. Kim, *FoxP3+ T cells undergo conventional first switch to lymphoid tissue homing receptors in thymus but accelerated second switch to nonlymphoid tissue homing receptors in secondary lymphoid tissues*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 301-11.
96. Sather, B.D., et al., *Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1335-47.
97. Liston, A. and D.H. Gray, *Homeostatic control of regulatory T cell diversity*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 154-65.
98. Koch, M.A., et al., *The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation*. Nat Immunol, 2009. **10**(6): p. 595-602.
99. Hall, A.O., et al., *The cytokines interleukin 27 and interferon-gamma promote distinct Treg cell populations required to limit infection-induced pathology*. Immunity, 2012. **37**(3): p. 511-23.
100. Cipolletta, D., et al., *PPAR-gamma is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells*. Nature, 2012. **486**(7404): p. 549-53.
101. Burzyn, D., et al., *A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair*. Cell, 2013. **155**(6): p. 1282-1295.
102. Lu, J., et al., *Phenotype and function of tissue-resident unconventional Foxp3-expressing CD4 regulatory T cells*. Cell Immunol, 2015.
103. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
104. Khattri, R., et al., *An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 337-42.
105. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
106. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
107. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 295-302.
108. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 303-10.
109. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
110. Wing, K., et al., *CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function*. Science, 2008. **322**(5899): p. 271-5.
111. McHugh, R.S., et al., *CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor*. Immunity, 2002. **16**(2): p. 311-23.

112. Shimizu, J., et al., *Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 135-42.
113. Yamaguchi, T., et al., *Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor*. Immunity, 2007. **27**(1): p. 145-59.
114. Borsellino, G., et al., *Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1225-32.
115. Deaglio, S., et al., *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
116. Kobie, J.J., et al., *T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6780-6.
117. Huang, C.T., et al., *Role of LAG-3 in regulatory T cells*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 503-13.
118. Workman, C.J. and D.A. Vignali, *Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223)*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 688-95.
119. Liang, B., et al., *Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5916-26.
120. Takeda, I., et al., *Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells*. J Immunol, 2004. **172**(6): p. 3580-9.
121. Valzasina, B., et al., *Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2845-51.
122. Gri, G., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction*. Immunity, 2008. **29**(5): p. 771-81.
123. Raimondi, G., et al., *Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 2808-16.
124. Park, H.J., et al., *PD-1 upregulated on regulatory T cells during chronic virus infection enhances the suppression of CD8+ T cell immune response via the interaction with PD-L1 expressed on CD8+ T cells*. J Immunol, 2015. **194**(12): p. 5801-11.
125. Simonetta, F., et al., *Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells*. Eur J Immunol, 2010. **40**(9): p. 2528-38.
126. Gratz, I.K., et al., *Cutting Edge: memory regulatory t cells require IL-7 and not IL-2 for their maintenance in peripheral tissues*. J Immunol, 2013. **190**(9): p. 4483-7.
127. Wang, R., et al., *Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2705.
128. Tran, D.Q., et al., *GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13445-50.
129. Edwards, J.P., et al., *Regulation of the expression of GARP/latent TGF-beta1 complexes on mouse T cells and their role in regulatory T cell and Th17 differentiation*. J Immunol, 2013. **190**(11): p. 5506-15.

130. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta*. J Exp Med, 2001. **194**(5): p. 629-44.
131. Nakamura, K., et al., *TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 834-42.
132. Annacker, O., et al., *CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3008-18.
133. Sundstedt, A., et al., *Role for IL-10 in suppression mediated by peptide-induced regulatory T cells in vivo*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1240-8.
134. Rubtsov, Y.P., et al., *Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 546-58.
135. Szanya, V., et al., *The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7*. J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2461-5.
136. Venturi, G.M., et al., *CD25+CD4+ regulatory T cell migration requires L-selectin expression: L-selectin transcriptional regulation balances constitutive receptor turnover*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 291-300.
137. Smigielski, K.S., et al., *CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets*. J Exp Med, 2014. **211**(1): p. 121-36.
138. Firan, M., et al., *Suppressor activity and potency among regulatory T cells is discriminated by functionally active CD44*. Blood, 2006. **107**(2): p. 619-27.
139. Bollyky, P.L., et al., *CD44 costimulation promotes FoxP3+ regulatory T cell persistence and function via production of IL-2, IL-10, and TGF-beta*. J Immunol, 2009. **183**(4): p. 2232-41.
140. Lehmann, J., et al., *Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 13031-6.
141. Suffia, I., et al., *A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of Leishmania major infection*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5444-55.
142. Beyersdorf, N., et al., *Characterization of mouse CD4 T cell subsets defined by expression of KLRG1*. Eur J Immunol, 2007. **37**(12): p. 3445-54.
143. Feuerer, M., et al., *Genomic definition of multiple ex vivo regulatory T cell subphenotypes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(13): p. 5919-24.
144. Zhao, J., et al., *IFN-gamma- and IL-10-expressing virus epitope-specific Foxp3(+) T reg cells in the central nervous system during encephalomyelitis*. J Exp Med, 2011. **208**(8): p. 1571-7.
145. Koenecke, C., et al., *IFN-gamma production by allogeneic Foxp3+ regulatory T cells is essential for preventing experimental graft-versus-host disease*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2890-6.
146. Lund, J.M., et al., *Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells*. Science, 2008. **320**(5880): p. 1220-4.
147. Oldenhove, G., et al., *Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection*. Immunity, 2009. **31**(5): p. 772-86.

148. Benson, A., et al., *Microbial infection-induced expansion of effector T cells overcomes the suppressive effects of regulatory T cells via an IL-2 deprivation mechanism*. J Immunol, 2012. **188**(2): p. 800-10.
149. de Araujo, F.F., et al., *Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(5): p. e992.
150. de Araujo, F.F., et al., *Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity*. Immunobiology, 2012. **217**(8): p. 768-77.
151. Guedes, P.M., et al., *Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(4): p. e1630.
152. Mariano, F.S., et al., *The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection*. Microbes Infect, 2008. **10**(7): p. 825-33.
153. Sales, P.A., Jr., et al., *The regulatory CD4+CD25+ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with Trypanosoma cruzi*. Microbes Infect, 2008. **10**(6): p. 680-8.
154. Kotner, J. and R. Tarleton, *Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of Trypanosoma cruzi infection in mice*. Infect Immun, 2007. **75**(2): p. 861-9.
155. Bonney, K.M., et al., *Depletion of regulatory T cells decreases cardiac parasitosis and inflammation in experimental Chagas disease*. Parasitol Res, 2015. **114**(3): p. 1167-1178.
156. Couper, K.N., et al., *Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3+ regulatory T cells following anti-CD25 treatment in malaria-infected mice*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4136-46.
157. Tosello Boari, J., et al., *IL-17RA Signaling Reduces Inflammation and Mortality during Trypanosoma cruzi Infection by Recruiting Suppressive IL-10-Producing Neutrophils*. PLoS Pathog, 2012. **8**(4): p. e1002658.
158. Tosello Boari, J., et al., *Interleukin-17 A and F sustain CD8+ T cell response to Trypanosoma cruzi by modulating survival, differentiation and exhaustion partially through CD8+ T cell-intrinsic IL-17RA signaling*. Revista Medicina, 2014. **74**(III).
159. Bermejo, D.A., et al., *Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors RORgammat and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells*. Nat Immunol, 2013. **14**(5): p. 514-22.
160. Gorosito Serran, M., et al., *Unconventional Pro-inflammatory CD4(+) T Cell Response in B Cell-Deficient Mice Infected with Trypanosoma cruzi*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1548.
161. Haribhai, D., et al., *Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2961-72.
162. Zingales, B., et al., *A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104**(7): p. 1051-4.
163. Gonzalez, F.B., et al., *Immunoendocrine dysbalance during uncontrolled T. cruzi infection is associated with the acquisition of a Th-1-like phenotype by Foxp3(+) T cells*. Brain Behav Immun, 2015. **45**: p. 219-32.

164. Roggero, E., et al., *Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute Trypanosoma cruzi infection*. J Endocrinol, 2006. **190**(2): p. 495-503.
165. de Titto, E.H. and F.G. Araujo, *Serum neuraminidase activity and hematological alterations in acute human Chagas' disease*. Clin Immunol Immunopathol, 1988. **46**(1): p. 157-61.
166. Nagajyothi, F., et al., *Alterations in glucose homeostasis in a murine model of Chagas disease*. Am J Pathol, 2013. **182**(3): p. 886-94.
167. Nunes, M.C., et al., *Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(9): p. 767-76.
168. Rossi, M.A., et al., *Coronary microvascular disease in chronic Chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanisms*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(8).
169. Rosenberg, C.S., et al., *Long-Term Immunity to Trypanosoma cruzi in the Absence of Immunodominant trans-Sialidase-Specific CD8+ T Cells*. Infect Immun, 2016. **84**(9): p. 2627-38.
170. Altman, J.D. and M.M. Davis, *MHC-peptide tetramers to visualize antigen-specific T cells*. Curr Protoc Immunol, 2003. **Chapter 17**: p. Unit 17 3.
171. Sims, S., C. Willberg, and P. Klenerman, *MHC-peptide tetramers for the analysis of antigen-specific T cells*. Expert Rev Vaccines, 2010. **9**(7): p. 765-74.
172. Starborg, M., et al., *The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression*. J Cell Sci, 1996. **109 ( Pt 1)**: p. 143-53.
173. Shevach, E.M. and A.M. Thornton, *tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences*. Immunol Rev, 2014. **259**(1): p. 88-102.
174. Pasztoi, M., J. Pezoldt, and J. Huehn, *Microenvironment Matters: Unique Conditions Within Gut-Draining Lymph Nodes Favor Efficient De Novo Induction of Regulatory T Cells*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2015. **136**: p. 35-56.
175. Tanoue, T., K. Atarashi, and K. Honda, *Development and maintenance of intestinal regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(5): p. 295-309.
176. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
177. Korn, T., et al., *IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 484-7.
178. Basu, R., et al., *IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the TH17 cell-iTreg cell balance*. Nat Immunol, 2015. **16**(3): p. 286-295.
179. Silva, G.K., et al., *Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain inflammasomes mediate IL-1beta response and host resistance to Trypanosoma cruzi infection*. J Immunol, 2013. **191**(6): p. 3373-83.
180. Chessler, A.D., et al., *Type I interferons increase host susceptibility to Trypanosoma cruzi infection*. Infect Immun, 2011. **79**(5): p. 2112-9.
181. Sousa, G.R., et al., *Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e87082.



182. Keating, S.M., et al., *Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease*. *Int J Cardiol*, 2015. **199**: p. 451-9.
183. Sanmarco, L.M., et al., *IL-6 Improves the Nitric Oxide-Induced Cytotoxic CD8+ T Cell Dysfunction in Human Chagas Disease*. *Front Immunol*, 2016. **7**: p. 626.
184. Paroli, A.F., et al., *Absence of Caspase1/11 favours a T helper 2-like response and protects mice from liver damage during acute Trypanosoma cruzi infection*. *Revista Medicina*, 2016. **76**(I): p. 258.
185. Li, P., et al., *Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock*. *Cell*, 1995. **80**(3): p. 401-11.
186. Fantuzzi, G., et al., *Response to local inflammation of IL-1 beta-converting enzyme-deficient mice*. *J Immunol*, 1997. **158**(4): p. 1818-24.
187. Siegmund, B., et al., *IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(23): p. 13249-54.
188. Wang, W., et al., *Endotoxemic acute renal failure is attenuated in caspase-1-deficient mice*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005. **288**(5): p. F997-1004.
189. Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder, *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. *Nat Rev Genet*, 2009. **10**(1): p. 57-63.
190. Cretney, E., et al., *The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(4): p. 304-11.
191. Arpaia, N., et al., *A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection*. *Cell*, 2015. **162**(5): p. 1078-89.
192. Eulitz, S., et al., *Identification of Xin-repeat proteins as novel ligands of the SH3 domains of nebulin and nebullette and analysis of their interaction during myofibril formation and remodeling*. *Mol Biol Cell*, 2013. **24**(20): p. 3215-26.
193. Collison, L.W. and D.A. Vignali, *In vitro Treg suppression assays*. *Methods Mol Biol*, 2011. **707**: p. 21-37.
194. Larange, A. and H. Cheroutre, *Retinoic Acid and Retinoic Acid Receptors as Pleiotropic Modulators of the Immune System*. *Annu Rev Immunol*, 2016. **34**: p. 369-94.
195. Mucida, D., et al., *Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid*. *Science*, 2007. **317**(5835): p. 256-60.
196. Kang, S.G., et al., *Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3+ regulatory T cells*. *J Immunol*, 2007. **179**(6): p. 3724-33.
197. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism*. *J Exp Med*, 2007. **204**(8): p. 1757-64.
198. Sun, C.M., et al., *Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid*. *J Exp Med*, 2007. **204**(8): p. 1775-85.
199. Nolting, J., et al., *Retinoic acid can enhance conversion of naive into regulatory T cells independently of secreted cytokines*. *J Exp Med*, 2009. **206**(10): p. 2131-2139.
200. Kang, S.G., et al., *High and low vitamin A therapies induce distinct FoxP3+ T-cell subsets and effectively control intestinal inflammation*. *Gastroenterology*, 2009. **137**(4): p. 1391-402 e1-6.

201. Van, Y.H., et al., *All-trans retinoic acid inhibits type 1 diabetes by T regulatory (Treg)-dependent suppression of interferon-gamma-producing T-cells without affecting Th17 cells*. Diabetes, 2009. **58**(1): p. 146-55.
202. Zhao, J., C.M. Lloyd, and A. Noble, *Th17 responses in chronic allergic airway inflammation abrogate regulatory T-cell-mediated tolerance and contribute to airway remodeling*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(2): p. 335-46.
203. Benson, M.J., et al., *All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1765-74.
204. Kanamori, M., et al., *Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications*. Trends Immunol, 2016. **37**(11): p. 803-811.
205. Singer, B.D., L.S. King, and F.R. D'Alessio, *Regulatory T cells as immunotherapy*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 46.
206. Floess, S., et al., *Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells*. PLoS Biol, 2007. **5**(2): p. e38.
207. Chen, Q., et al., *IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF-beta-induced Foxp3+ T cells in vivo*. J Immunol, 2011. **186**(11): p. 6329-37.
208. Ohkura, N. and S. Sakaguchi, *Treg cells acquire new directions, cytokines navigate*. Immunity, 2012. **37**(3): p. 443-4.
209. Wilson, C.B., E. Rowell, and M. Sekimata, *Epigenetic control of T-helper-cell differentiation*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(2): p. 91-105.
210. Lahl, K., et al., *Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 57-63.
211. Lahl, K. and T. Sparwasser, *In vivo depletion of FoxP3+ Tregs using the DEREK mouse model*. Methods Mol Biol, 2011. **707**: p. 157-72.
212. Fiocca Vernengo, F., et al., *B cells sustain Trypanosoma cruzi specific CD8+ T cell response via IL-17*. Revista Medicina, 2017. **77**(I).
213. Golden, J.M. and R.L. Tarleton, *Trypanosoma cruzi: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity*. Exp Parasitol, 1991. **72**(4): p. 391-402.
214. McCabe, R.E., S.G. Meagher, and B.T. Mullins, *Endogenous interferon-gamma, macrophage activation, and murine host defense against acute infection with Trypanosoma cruzi*. J Infect Dis, 1991. **163**(4): p. 912-5.
215. Torrico, F., et al., *Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute Trypanosoma cruzi infection in mice*. J Immunol, 1991. **146**(10): p. 3626-32.
216. Brener, Z. and R.T. Gazzinelli, *Immunological control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease*. Int Arch Allergy Immunol, 1997. **114**(2): p. 103-10.
217. Savino, W., et al., *Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to Trypanosoma cruzi*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(1-2): p. 107-24.
218. Belkaid, Y. and K. Tarbell, *Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 551-89.
219. Hansen, D.S. and L. Schofield, *Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies?* PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000771.
220. Belkaid, Y., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity*. Nature, 2002. **420**(6915): p. 502-7.

221. Suffia, I.J., et al., *Infected site-restricted Foxp3+ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 777-88.
222. Hoseini, S.G., et al., *Regulatory T-cell profile in early and late lesions of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major*. J Res Med Sci, 2012. **17**(6): p. 513-8.
223. Palermo, M.L., et al., *Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy*. Am J Trop Med Hyg, 2012. **86**(5): p. 878-83.
224. Fernandes, C., et al., *Increased frequency of CD4 and CD8 regulatory T cells in individuals under 15 years with multibacillary leprosy*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79072.
225. Scott-Browne, J.P., et al., *Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis*. J Exp Med, 2007. **204**(9): p. 2159-69.
226. Kursar, M., et al., *Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2661-5.
227. Andersson, J., et al., *The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3143-7.
228. Xu, D., et al., *Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 739-47.
229. Walther, M., et al., *Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection*. Immunity, 2005. **23**(3): p. 287-96.
230. Nesburn, A.B., et al., *Functional Foxp3+ CD4+ CD25(Bright+) "natural" regulatory T cells are abundant in rabbit conjunctiva and suppress virus-specific CD4+ and CD8+ effector T cells during ocular herpes infection*. J Virol, 2007. **81**(14): p. 7647-61.
231. Srivastava, S., et al., *Type I interferons directly inhibit regulatory T cells to allow optimal antiviral T cell responses during acute LCMV infection*. J Exp Med, 2014. **211**(5): p. 961-74.
232. Gratz, I.K. and D.J. Campbell, *Organ-specific and memory treg cells: specificity, development, function, and maintenance*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 333.
233. Tarleton, R.L., *Trypanosoma cruzi-induced suppression of IL-2 production. I. Evidence for the presence of IL-2-producing cells*. J Immunol, 1988. **140**(8): p. 2763-8.
234. Nabors, G.S. and R.L. Tarleton, *Differential control of IFN-gamma and IL-2 production during Trypanosoma cruzi infection*. J Immunol, 1991. **146**(10): p. 3591-8.
235. Briceno, L. and W. Mosca, *Defective production of interleukin 2 in patients with Chagas' disease. Purified IL-2 augments in vitro response in patients with chagasic cardiomyopathy*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1996. **91**(5): p. 601-7.
236. Raynor, J., et al., *IL-15 Fosters Age-Driven Regulatory T Cell Accrual in the Face of Declining IL-2 Levels*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 161.
237. Bouziat, R., et al., *Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease*. Science, 2017. **356**(6333): p. 44-50.
238. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.

239. Kretschmer, K., et al., *Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen*. Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1219-27.
240. Ersching, J., et al., *A Human Trypanosome Suppresses CD8+ T Cell Priming by Dendritic Cells through the Induction of Immune Regulatory CD4+ Foxp3+ T Cells*. PLoS Pathog, 2016. **12**(6): p. e1005698.
241. Poncini, C.V., et al., *Trypanosoma cruzi Infection Imparts a Regulatory Program in Dendritic Cells and T Cells via Galectin-1-Dependent Mechanisms*. J Immunol, 2015. **195**(7): p. 3311-24.
242. Smith, P.M., et al., *The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis*. Science, 2013. **341**(6145): p. 569-73.
243. Furusawa, Y., et al., *Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells*. Nature, 2013. **504**(7480): p. 446-50.
244. Hall, J.A., et al., *Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses*. Immunity, 2008. **29**(4): p. 637-49.
245. Gelman, A.E., et al., *Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 6065-73.
246. Hasenkrug, K.J., C.A. Chougnet, and U. Dittmer, *Regulatory T cells in retroviral infections*. PLoS Pathog, 2018. **14**(2): p. e1006776.
247. Ferreira, L.R., et al., *Blood Gene Signatures of Chagas Cardiomyopathy With or Without Ventricular Dysfunction*. J Infect Dis, 2017. **215**(3): p. 387-395.
248. Kopf, M., et al., *Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice*. Nature, 1994. **368**(6469): p. 339-42.
249. Kuida, K., et al., *Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme*. Science, 1995. **267**(5206): p. 2000-3.
250. Muller, U., et al., *Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense*. Science, 1994. **264**(5167): p. 1918-21.
251. Piron, M., et al., *Development of a real-time PCR assay for Trypanosoma cruzi detection in blood samples*. Acta Trop, 2007. **103**(3): p. 195-200.
252. Martínez-González, M.A., A. Sánchez-Villegas, and F.J. Faulin Fajardo, *Bioestadística amigable*. 2da ed. 2006, España.

# PRODUCCIÓN CIENTÍFICA



## Publicaciones

**CD39 expression defines cell exhaustion in tumor-infiltrating CD8+ T cells.**

FP Canale, MC Ramello, N Núñez, CL Araujo Furlan, SN Bossio, M Gorosito Serrán, J Tosello Boari, A Del Castillo, M Ledesma, C Sedlik, E Piaggio, A Gruppi, EV Acosta Rodriguez, CL Montes.

Cancer Research. 2017 Oct 24. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2684.

## Presentaciones en congresos y conferencias

11/2017 - Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias, Buenos Aires.

**“Reduced frequency of activated Foxp3+ regulatory T cells allows the emergence of specific CD8+ T cell immunity during *T. cruzi* infection”**

C Araujo Furlan, J Tosello Boari, C Rodriguez, F Canale, F Fiocca Vernengo, S Boccardo, A Gruppi, C Montes, E Acosta Rodriguez.

Póster. Revista Medicina, Buenos Aires. Vol 77, Supl. I – 2017.

**“Study of the role of tissue resident regulatory T cells during *Trypanosoma cruzi* infection”**

S Boccardo, CL Araujo Furlan, C Rodriguez, L Almada, CP Abrate, CL Montes, A Gruppi, EV Acosta Rodriguez

Póster. Revista Medicina, Buenos Aires. Vol 77, Supl. I – 2017.

**“Deficiency in the IL-17RA/IL-17 pathway affects protective CD8+ T cell immunity in a model of tumor vaccination”**

C Rodriguez, J Tosello Boari, C Araujo Furlan, F Canale, C Beccaria, S Boccardo, A Gruppi, C Montes, E Acosta Rodriguez.

Presentación mini-oral. Revista Medicina, Buenos Aires. Vol 77, Supl. I – 2017.

**“B cells sustain *Trypanosoma cruzi* specific CD8+ T cell response via IL-17”**

F Fiocca Vernengo, CG Beccaria, L Almada, CL Araujo Furlan, J Tosello Boari, CL Montes, EV Acosta Rodriguez, A Gruppi.

Póster. Revista Medicina, Buenos Aires. Vol 77, Supl. I – 2017.

11/2016 - LXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI), Mar del Plata.

**“RNAseq analysis revealed that Foxp3+ regulatory T cells acquire Th1-like and tissue repair programs during experimental *Trypanosoma cruzi* infection”**

C Araujo Furlan, V Adoue, J Fourquet, J Tosello Boari, C Rodriguez, F Canale, F Fiocca, C Beccaria, A Gruppi, C Montes, O Joffre, E Acosta Rodriguez.

Póster. Revista Medicina, Buenos Aires. Vol 76, Supl. I – 2016.

**“Deficiency in the IL-17RA/IL-17 pathway affects primary and secondary antitumor responses promoting tumor growth”**

C Rodriguez, J Tosello Boari, C Araujo Furlan, FP Canale, CG Beccaria, A Gruppi, CL Montes, EV Acosta Rodriguez.

Presentación oral. Revista Medicina, Buenos Aires. Vol 76, Supl. I – 2016.

**“CD39 delineates cell exhaustion in mouse and human tumor-associated CD8+ T cells: a possible immunomodulatory role of a “dysfunctional” cell subset”**

FP Canale, MC Ramello, N Núñez, CL Araujo Furlan, M Gorosito Serrán, J Tosello Boari, SN Bossio, A Del Castillo, M Ledesma, C Sedlik, E Piaggio, A Gruppi, EV Acosta Rodriguez, CL Montes.

Póster. Revista Medicina, Buenos Aires. Vol 76, Supl. I – 2016.

08/2016 - International Congress of Immunology (ICI 2016), Melbourne, Australia.

**“B cell depletion compromises CD8+ T cell response in murine *T cruzi* infection”**

F Fiocca Vernengo, CG Beccaria, C Araujo Furlan, J Tosello Boari, M Gorosito Serrán, C Montes, E Acosta Rodriguez, A Gruppi.

Póster.

06/2016 - Gordon Research Conference: Immunochemistry & Immunobiology, Lucca (Barga), Italia.

**“Limited induction of Foxp3+ regulatory T cell during experimental *Trypanosoma cruzi* infection allows the generation of robust effector responses and parasite control”**

C Araujo Furlan, J Tosello Boari, C Rodriguez, F Canale, F Fiocca Vernengo, C Beccaria, A Gruppi, C Montes, E Acosta Rodriguez.

Póster.

11/2015 - I Meeting LASID-FAIC-SAI, Buenos Aires.

**“Limited induction of Foxp3+ regulatory T cell during experimental *Trypanosoma cruzi* infection allows the generation of robust effector responses and parasite control”**

Araujo Furlan C, Tosello Boari J, Rodriguez C, Canale F, Fiocca Vernengo F, Beccaria C, Gruppi A, Montes C, Acosta Rodriguez E.

Póster.

**“Study of the role of the cytokines of the IL-17 family in the CTL immunity against tumors”**

Rodriguez C, Tosello Boari J, Araujo Furlan CL, Canale F, Gruppi A, Montes CL, Acosta Rodriguez EV.

Póster.

**“Study of the modulatory role of different tumor-infiltrating CD8 T cells subpopulations”**

Canale FP, Ramello C, Araujo Furlan C, Gorosito Serrán M, Tosello J, Gruppi A, Acosta Rodriguez E, Montes CL.

Póster.

**“B cell depletion compromises CD8+ T cell response during *Trypanosoma cruzi* infection”**

Fiocca Vernengo F, Beccaria CG, Tosello Boari J, Gorosito Serrán M, Araujo Furlan C, Acosta Rodriguez E, Montes C, Gruppi A.

Póster.



09/2015 - 4<sup>th</sup> European Congress of Immunology (ECI 2015), Viena, Austria.

**“T cell-intrinsic IL-17RA-signaling modulates CD8<sup>+</sup> T cell differentiation and exhaustion during *Trypanosoma cruzi* infection”**

J Tosello, C Araujo, F Fiocca, M Ramello, M Amezcua, M Gorosito, N Nuñez, N Cagnard, E Piaggio, C Montes, A Gruppi, E Acosta.  
Póster.

03/2015 - Keystone Symposia: T Cells: Regulation and Effector Function (D3), Snowbird, Utah, EEUU.

**“IL-17RA-signaling sustains immunity to *Trypanosoma cruzi* by modulating CD8<sup>+</sup> T cell survival, differentiation and exhaustion”**

Tosello Boari J, Araujo Furlan CL, Fiocca Vernengo F, Ramello MC, Amezcua Vesely MC, Gorosito Serrán M, Núñez N, Cagnard N, Piaggio E, Montes CL, Gruppi A, Acosta Rodriguez EV.  
Póster.

11/2014 - LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI), Mar del Plata.

**“Study of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell responses during experimental *Trypanosoma cruzi* infection”**

Araujo Furlan C, Tosello Boari J, Canale F, Beccaria C, Fiocca Vernengo F, Gruppi A, Montes C, Acosta Rodriguez E.  
Póster. Revista Medicina, Buenos Aires. Vol 74, Supl. III – 2014.

**“Interleukin-17 A and F sustain CD8<sup>+</sup> T cell response to *T. cruzi* by modulating survival, differentiation and exhaustion partially through CD8<sup>+</sup> T cell-intrinsic IL-17RA signaling”**

Tosello Boari J, Araujo Furlan C, Fiocca Vernengo F, Ramello M, Gorosito Serrán M, Montes C, Gruppi A, Acosta Rodriguez E.  
Póster. Revista Medicina, Buenos Aires. Vol 74, Supl. III – 2014.

**“PD-1<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> T cells from 4T1 tumor-bearing mice display features of exhaustion and increased expression of immunomodulatory molecules”**

Canale FP, Ramello MC, Gorosito Serrán M, Araujo Furlan C, Tosello Boari J, Acosta Rodriguez E, Gruppi A, Montes C.  
Presentación oral. Revista Medicina, Buenos Aires. Vol 74, Supl. III – 2014.

11/2013 - LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI), Los Cocos, Córdoba.

**“Characterization of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell responses during experimental *Trypanosoma cruzi* infection”**

Araujo Furlan C, Tosello Boari J, Canale F, Ramello M, Gruppi A, Montes C, Acosta Rodriguez E.  
Póster.

**“IL-17RA regulates the magnitude of CD8<sup>+</sup> T cell response to *T. cruzi* by modulating apoptosis, cell exhaustion and memory differentiation”**

Tosello Boari J, Fiocca Vernengo F, Ramello M, Amezcua Vesely M, Araujo Furlan C, Gorosito Serrán M, Montes C, Gruppi A, Acosta Rodriguez E.

Presentación oral a Premio “Leonardo Satz”.

**“Exhausted T cells (Tim-3<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>) infiltrate tumors of 4T1 mammary carcinoma bearing mice”**

Canale FP, Ramello MC, Tosello Boari J, Araujo Furlan C, Gorosito Serrán M, Acosta Rodriguez E, Montes C.

Presentación oral.

"J'ai découvert une merveilleuse démonstration  
mais la marge est trop étroite pour la contenir"

Pierre de Fermat