



C I B I C I

Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Químicas - Departamento de Bioquímica Clínica  
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología CIBICI-CONICET-UNC

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**DESVÍO EN LA ONTOGENIA DE TIMOCITOS SP  
CD8 DESDE EL LINAJE CONVENCIONAL HACIA EL  
INNATO EN SITUACIONES  
INFECCIOSAS/INFLAMATORIAS TH1**

Lic. en Química  
**NATALIA SOLEDAD BAEZ**

Directora de Tesis: Dra. María Cecilia Rodríguez Galán

Córdoba, Argentina

-2016-

**Comisión Asesora:**

Dra. Cristina Motrán

Dra. Cristina Maldonado

Dr. Germán Roth

**Evaluador Externo:**

Dra. Ana Rosa Pérez

El presente trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FONCyT), y la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (Secyt-UNC).

A mis padres por apoyarme en cada etapa de mi vida y por su amor incondicional.

## AGRADECIMIENTOS

En cada etapa de la vida uno se encuentra en el camino con un sinnúmero de personas que le brindan su ayuda y su amistad y que hacen que el día a día sea más fácil y lindo.

Quiero comenzar agradeciendo a mi grupo de trabajo. En primer lugar a Ceci Rodríguez que me permitió hacer un doctorado con ella y que confió en mí desde el comienzo. Además de haber sido mi directora de tesis, pudimos crear una hermosa relación que nos permitió compartir momentos importantes de nuestras vidas y que se hizo muy fuerte con el paso de los años. Siempre me acompañaste y puedo decir que sos una excelente persona, con una fuerza increíble para afrontar cada desafío en tu vida y salir adelante. A Coni mi compañera y amiga, muchas gracias por estar siempre presente, por tu buena onda y tu compañía en el día a día, por tus consejos y ayuda incondicional.

A la comisión de tesis (Cristina Maldonado, Cristina Motrán, Clara Monferran y Germán Roth) por acompañarme y ayudarme siempre con la mejor onda en cada reunión de tesis y sobretodo en esta etapa final de escritura.

A la Dra. Ana Rosa Pérez por acceder a ser la evaluadora externa de la tesis y porque junto al Dr. Oscar Botasso y al Dr. Eduardo Roggero me dieron la posibilidad de ir a su laboratorio en Rosario, para aprender la inyección intratímica.

Agradezco a todos los integrantes del laboratorio 104, Silvia, Claudia, Vicky, Dra. Riera, Rubén, Mariana y Paula porque me hicieron sentir parte desde el comienzo y siempre recibí muy buena onda de su parte. A Paula en especial porque compartimos muchas charlas, laborales y personales, en el box y a Claudia y Silvia porque siempre fueron muy atentas y cariñosas conmigo.

Muy especialmente a mis amigos del 104, aquellos con los que comenzamos y los que fueron entrando en estos cinco años, por su compañía y contención, porque hacen que siempre se empiece el día de la mejor manera. Sole y Bibi muchas gracias por su amistad incondicional, porque comenzamos juntas a transitar este camino del doctorado y pudimos formar una hermosa amistad llena de increíbles recuerdos, risas, compañía en los buenos y malos momentos. Las quiero muchísimo y espero que sin importar que nos depare el destino al terminar el doctorado conservemos nuestra amistad. A Ceci, Emi, Jan, Pauli, Lisa, Ivi, Flor, Caro con quienes formamos un hermoso grupo de amigas y para los que dicen que es difícil un laboratorio con tantas mujeres, puedo asegurar que cuando son mujeres como éstas

con tanta buena onda, alegría, compañerismo, respeto, se puede formar un grupo increíble para compartir miles de tardes, cenas, salidas y siempre pasarla bien y sentirse acompañada y querida, muchas gracias chicas. A Leo por tus consejos, tu amistad y tu alegría, por tantos apodosos graciosos y la buena onda que te caracteriza. A Emi Roselli, Lucho, David, Laura, Nico, muchas gracias por su buena onda y por estar siempre dispuestos a brindar consejos y ayuda en el laboratorio. Gera quiero agradecerte por tu gran ayuda en los experimentos de citometría y la buena onda con la que me trataste siempre. Estoy muy agradecida por el laboratorio del cuál fui parte porque estuve rodeada de personas increíbles a las que quiero mucho y con las que compartimos momentos que siempre voy a recordar con una sonrisa.

Quiero agradecer también al laboratorio del Dr. Pablo Iribarren, Javi, Dani, Emi y Claudio porque siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y por su alegría en cada experimento y salidas compartidas.

Agradezco al laboratorio 103 por la buena predisposición y ayuda que recibí siempre que lo necesité, tanto de becarios como jefes. En especial a Eva Acosta, Jime y Cintia que me brindaron su ayuda en muchos experimentos siempre con muy buena onda. A Fabio que fue como un integrante más del grupo Rodríguez, siempre dispuesto a ayudarme con los pases, con los experimentos y con las presentaciones, muchas gracias. A todos los chicos del grupo "Pase" que me incluyeron y me dieron una mano cada vez que lo necesité y siempre de la mejor manera.

A Paula Abadie y Pilar Crespo les agradezco mucho por su asistencia en tantas horas de citometría y sort, porque siempre me trataron muy bien y estuvieron dispuestas a ayudarme cada vez que lo necesité. Agradezco a todos los CPA del instituto porque siempre me brindaron buena onda y me ayudaron.

También quiero agradecer a todos los integrantes de CIBICI porque en el día a día en el laboratorio siempre se necesita la ayuda de alguien y todos están dispuestos a brindarla en cualquier momento.

A mis amigos de la facultad (Mari, Flor, Flor G., Carla, Javi, Leo, Pablo, Claudio), del CIQUIBIC (Lau, Luci, Mario, Ali) y de la vida (Lau, Yoy, Flor) porque siempre están presentes, a pesar de todas las ocupaciones que tenemos cada día, muchas gracias, los quiero mucho.

Quiero agradecer especialmente a mi familia. A mis padres por enseñarme a salir adelante en cada objetivo de vida, por apoyarme incondicionalmente, por estar siempre a mi lado para alentarme, aconsejarme, consolarme, darme fuerzas pero sobre todo por darme ese amor tan puro que llena el alma, porque son mi ejemplo de personas y familia, los amo!. A mi hermana, gracias por estar a mi lado a pesar de nuestras diferencias y apoyarme y darme cariño, te quiero mucho. A mis tíos Sandra y Marce y mis primos Facu y Luci porque son incondicionales, porque están siempre para apoyarme, acompañarme, porque son muy importantes para mí y porque me brindan mucho amor, un gracias inmenso. A mi abuela, Graciela, que hoy me acompaña desde el cielo, que es un ejemplo de mujer a seguir, que nunca bajó los brazos y salió adelante y que siempre nos dio su amor incondicional, e hizo hasta lo imposible por nosotros y sobretodo me dio esta increíble familia.

Quiero agradecer también a toda la familia de Nico, en especial a Carmen y Jorge, porque me aceptaron como parte de su familia y me brindan mucho cariño y amor.

Nico, mi amor, quiero agradecerte muchísimo porque me haces feliz cada día, porque siempre me apoyas en mis decisiones, por tu cariño y comprensión, y porque sos el ejemplo de una buena persona, responsable, trabajadora, capaz de lograr todo lo que se propone. Gracias por darme tu amor! Te amo!

Muchas gracias, de corazón!!

# ÍNDICE

RESUMEN .....	IV
ABREVIATURAS .....	VII
INTRODUCCIÓN .....	11
Timo: órgano linfático primario .....	12
Desarrollo y diferenciación de las células T convencionales en timo .....	14
Maduración post-tímica: Recientes emigrantes tímicos (RTE) .....	19
Alteraciones en el timo luego de procesos inflamatorios/infecciosos .....	21
Células T CD8 innatas .....	25
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	32
RESULTADOS .....	35
<b>CAPITULO I: RECIRCULACIÓN DE LINFOCITOS ACTIVADOS DESDE ORGANOS LINFATICOS SECUNDARIOS (OLS) HACIA TIMO DURANTE CONDICIONES INFECCIOSAS INFLAMATORIAS TIPO TH1</b> .....	36
Caracterización de linfocitos con fenotipo activado/memoria que se encuentran en timo durante condiciones infecciosas inflamatorias tipo Th1 .....	36
Localización y especificidad de las células CD44 <sup>hi</sup> presentes en timo durante procesos infecciosos/inflamatorios de tipo Th1 .....	41
Conclusiones capítulo I .....	45
<b>CAPITULO II: CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS CD8 INNATAS EN TIMO DURANTE CONDICIONES INFECCIOSAS INFLAMATORIAS TIPO TH1</b> .....	46
Fenotipo de las células T SP CD8 CD44 <sup>hi</sup> encontradas en timo después de la infección con <i>T. cruzi</i> .....	46
Estudio del microambiente tímico: expresión de moléculas CMH-I no clásicas .....	47



Expresión de factores de transcripción como Eomes y Tbet en las células T CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>hi</sup> durante procesos infecciosos/inflamatorios.....	50
Producción de IFN $\gamma$ de las células T CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>hi</sup> Eomes <sup>+</sup> con características innatas	53
Expresión local de IL-15 y de su receptor en timo durante condiciones infecciosas/inflamatorias de tipo Th1 .....	54
Expresión local de IL-4 y de su receptor en timo durante condiciones infecciosas/inflamatorias de tipo Th1 .....	56
Evaluación de la capacidad de las células innatas CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>hi</sup> Eomes <sup>+</sup> para responder a IL-15 e IL-4.....	57
Conclusiones capítulo II.....	60
<b>CAPITULO III: CAPACIDAD PROTECTIVA DE LAS CÉLULAS SP CD8 INNATAS GENERADAS EN TIMO DURANTE PROCESOS INFECCIOSOS/INFLAMATORIOS SISTÉMICOS DE TIPO TH1 .....</b>	<b>62</b>
Evaluación de la capacidad funcional de las células SP CD8 CD44 <sup>hi</sup> innatas.....	62
Evaluación de la capacidad protectora de los timocitos SP CD8 CD44 <sup>hi</sup> innatos.....	63
Conclusiones capítulo III .....	68
<b>CAPITULO IV: MECANISMOS RESPONSABLES DE LOS CAMBIOS EN LA DECISIÓN DE LINAJE DE TIMOCITOS SP CD8 (CONVENCIONAL A INNATA) DURANTE CONDICIONES SISTÉMICAS INFECCIOSAS/INFLAMATORIAS TH1 .....</b>	<b>69</b>
Influencia del ambiente infeccioso/inflamatorio tipo Th1 en la generación de las células CD8 <sup>+</sup> innatas .....	69
Moléculas involucradas en el desvío del linaje T convencional a innato durante la infección con <i>T. cruzi</i> .....	71
Conclusiones capítulo IV .....	75
DISCUSION.....	76
CONCLUSION GENERAL.....	84
MATERIALES Y METODOS.....	87

---

Animales .....	88
Reactivos químicos .....	88
Modelos de inducción de inflamación sistémica de tipo Th1 .....	89
Purificación de plásmidos libres de endotoxina .....	90
Citometría de flujo .....	91
Cultivo celular.....	95
Microscopias.....	97
ELISA .....	98
Inyección Intratímica .....	100
Experimentos de sobrevida.....	101
Reacción de transcripción reversa de ARN y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) .....	103
Análisis estadístico .....	105
BIBLIOGRAFIA .....	106
PRODUCCION CIENTIFICA.....	114

# **RESUMEN**

---

**DESVÍO EN LA ONTOGENIA DE TIMOCITOS SP CD8 DESDE EL LINAJE  
CONVENCIONAL HACIA EL INNATO EN SITUACIONES  
INFECCIOSAS/INFLAMATORIAS TH1**

El timo es un órgano linfático primario de gran importancia para el sistema inmune ya que en él ocurre el desarrollo y diferenciación de los timocitos que van a constituir las células T, una de las poblaciones principales de la inmunidad adaptativa. El estudio del sistema inmune es muy complejo y continuamente existen reportes de nuevas células que participan en el desarrollo de la inmunidad y funciones de las mismas. Hace algunos años se describió la existencia de un grupo de células con características innatas, que derivan, al igual que las células T convencionales, de un timocito doble positivo. Se las llama “células innatas” porque presentan un fenotipo de memoria y al ser estimuladas producen rápidamente una gran cantidad de citoquinas de manera Ag-independiente. En particular se ha descrito una población de células T CD8<sup>+</sup> innatas que se desarrollan en animales con diferentes deficiencias genéticas en ciertas quinasas involucradas en la vía de señalización del TCR, presentan una gran diversidad en el repertorio de TCR al igual que las células T convencionales, presentan un fenotipo similar al de memoria (CD44<sup>hi</sup>CD122<sup>hi</sup>) y producen rápidamente IFN $\gamma$  al ser estimuladas. Estas células podrían participar en la primera línea de defensa junto al sistema inmune innato, antes de la generación de respuesta específica (inmunidad adaptativa). Han sido reportadas tanto en animales como en humanos y a su vez en situaciones patológicas como en cáncer. Sin embargo, es una población que está en estudio y de la cual no se dispone de tantos reportes en la actualidad.

En este trabajo de tesis estudiamos el desarrollo de células T CD8<sup>+</sup> innatas en modelos experimentales patofisiológicos que cursan con un fuerte componente Th1 y una gran producción de IL-12 más IL-18 en la etapa aguda. Los modelos experimentales utilizados son: infección con el parásito *Trypanosoma cruzi*, el hongo *Candida albicans* y la expresión sistémica de IL-12 más IL-18 mediante inyección hidrodinámica.

Los resultados obtenidos durante los diferentes procesos infecciosos/inflamatorios tipo Th1 demostraron que el timo sufre diversos cambios, entre ellos, alteraciones morfológicas (como atrofia tímica), cambios en el microambiente de citoquinas y en la diferenciación de los timocitos. Observamos que hay un incremento significativo de timocitos SP CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> que poseen un fenotipo similar al de una célula de memoria. Más aún, demostramos que estas células son células T CD8<sup>+</sup> innatas. Su desarrollo en timo se ve favorecido por la alta producción de IL-4 e IL-15 que hemos detectado en el microambiente

tímico durante estos procesos, que provoca el incremento en la expresión del factor de transcripción Eomesodermina (Eomes) y el desvío de la diferenciación de timocitos convencionales hacia el innatos. Estas células SP CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> Eomes<sup>+</sup> innatas son grandes productoras de IFN $\gamma$  y poseen propiedades citotóxicas caracterizadas por la elevada expresión de NKG2D y CD107a.

Mediante experimentos de transferencia adoptiva describimos que los timocitos SP CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> innatos ejercen un efecto protector durante la infección con *T. cruzi* aumentando la sobrevivencia de los animales frente al parásito.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral aportan evidencias en la caracterización y desarrollo de las células T CD8<sup>+</sup> innatas en condiciones patofisiológicas y su posible rol en infecciones que producen respuestas de tipo Th1, en particular la infección con *T. cruzi*.

**Palabras claves:**

Timo, Células T CD8<sup>+</sup> innatas, procesos infecciosos/inflamatorios tipo Th1, IL-12 más IL-18.

# **ABREVIATURAS**

- Ac:** Anticuerpo monoclonal.
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario.
- Ag:** Antígeno.
- Akt:** Proteína quinasa B (también conocida como PKB)
- ANOVA:** Análisis de la varianza.
- Anti-CD3:** Anticuerpo que reconoce a la molécula CD3
- APC:** Aloficocianina
- APC-Cy7:** Aloficocianina -cianina 7
- ARN:** Acido ribonucleico.
- ARNm:** Acido ribonucleico mensajero.
- C. albicans:*** *Candida albicans*.
- CBA:** Del inglés, *cytometric bead array*.
- CCR5:** Receptor de quimiocina tipo C-C 5.
- CD:** Célula Dendrítica.
- CD107a/LAMP-1:** Proteína de membrana asociada a lisosoma 1.
- CD11b:** Cadena alpha de integrina M.
- CD122:** Cadena beta del receptor de IL-2 e IL-15
- CD4:** Del inglés *cluster of differentiation 4*.
- CD44:** Del inglés *cluster of differentiation 44*.
- CD62-L:** L- selectina
- CD69:** Lectina tipo C 69.
- CD8:** Del inglés *cluster of differentiation 8*.
- CD8KO:** Ratones deficientes en células CD8.
- CECT:** Célula Epitelial Cortical Tímica.
- CEMT:** Célula Epitelial Medular Tímica.
- CET:** Célula Epitelial Tímica.
- CFSE:** Éster Succinimido de Carboxifluoresceína.
- CK5:** Citoqueratina 5
- CMH:** Complejo mayor de histocompatibilidad.
- col.:** Colaboradores
- CPA:** Células presentadoras de antígenos.
- CXC:** Quimiocina que presenta dos cisteínas (C) unidas por otro aminoácido (X).
- CXCR3:** Receptor de quimiocina tipo CXC.

**DN:** Timocito Doble Negativo.

**DP:** Timocito Doble Positivo.

**Dpi:** Días post infección.

**EDTA:** Ácido etilediaminotetraacético.

**eFluor:** Fluoresceína. Marcador de proliferación celular (450: violeta)

**ELISA:** Enzimoimmunoanálisis, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

**Eomes:** Eomesodermina.

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**h:** Hora/s

**H2Kb:** Subtipo de CMH clase I.

**HPRT-1:** Del inglés: *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*

**IFN ( $\gamma$ ):** Interferón (gamma).

**Ig:** Inmunoglobulina.

**IL- R:** Receptor de Interloquina

**IL-:** Interloquina.

**IL-4 KO:** Ratones deficientes en IL-4.

**ip:** Intraperitoneal.

**ITK:** Quinasa inducible por IL-2.

**iv:** Intravenoso

**KLF2:** Factor de transcripción tipo Krüppel 2.

**KLRG-1:** Del inglés, *killer cell lectin-like receptor G1*.

**KO:** Del inglés, *knock-out*.

**LCMV:** Virus de la coriomeningitis linfocítica.

**Lm:** *Listeria monocytogenes*.

**Ma:** Macrófago.

**MAIT:** Células T invariantes asociadas a las mucosas.

**MFI:** Intensidad de Fluorescencia Media.

**Min:** Minutos

**MO:** Médula Ósea.

**MR-1:** Proteína relacionada a CMH-I

**NF-KB:** Del inglés, *Nuclear factor kB*.

**NK:** Células o linfocitos *Natural Killer*.

**NKG2D:** Miembro D del grupo 2 de receptores de NK.

**NKT:** Células o linfocitos T tipo NK.



**OLP:** Órgano Linfático Primario.

**OLS:** Órgano Linfático Secundario.

**ORF:** Marco de lectura abierto.

**OT-I:** Animal transgénico con un TCR específico para OVA

**OVA:** Ovoalbúmina

**PBS:** Buffer fosfato salino.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**PE:** Ficoeritrina (del inglés: *phycoerithrin*).

**PE-Cy5:** Ficoeritrina-cianina 5

**PE-Cy7:** Ficoeritrina-cianina 7

**PerCP:** Proteína peridínina clorofila.

**PerCP-Cy5:** Proteína peridínina clorofila-cianina 5

**pi:** Post-infección

**PMA:** Acetato de forbol miristrato.

**RAG:** Gen activador de la recombinación (*del inglés: recombination activating gene*)

**RLK:** Quinasa de arresto de linfocitos.

**RT:** Transcripción Reversa.

**RTE:** Recientes emigrantes tímicos.

**SAP:** Proteína asociada a SLAM

**SEM:** Error estándar de la media (*del inglés: standard error mean*)

**SLAM:** Molécula linfocitaria activadora de señales (*del inglés: signaling lymphocyte-activation molecule*)

**SP:** Timocito Simple Positivo.

**STAT-6:** Factor transductor y activador de la transcripción 6

**T. cruzi:** *Trypanosoma Cruzi*.

**Tbet:** Del inglés, *T-box transcription factor TBX21*.

**TCR:** Receptor de la célula T.

**Th:** Linfocitos T CD4+ cooperadores (*del inglés: T helper lymphocytes*)

**TNF $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa (*del inglés: tumor necrosis factor alpha*).

**Treg:** Células T regulatorias.

**WT:** Ratones C57BL/6 del inglés *wild type*.

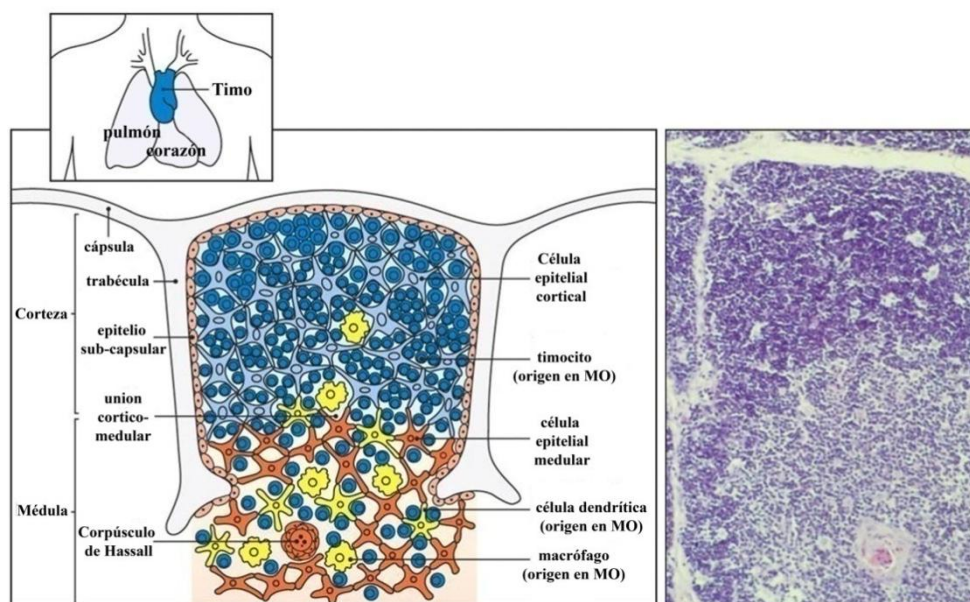
.

# INTRODUCCIÓN

## TIMO: ÓRGANO LINFÁTICO PRIMARIO

El timo es un órgano linfoide primario conformado por múltiples lóbulos que se ubica en la región antero superior del tórax por encima del corazón (Figura 1). En dicho órgano se encuentran los linfocitos T inmaduros, llamados timocitos, en sus distintos estadios de desarrollo junto a una red de células epiteliales conocidas como estroma tímico. El timo es el órgano encargado de mantener el desarrollo y la selección del repertorio de células T tolerantes a lo propio y capaces de reconocer antígenos (Ags) extraños (no propios)<sup>[1, 2]</sup>.

El estroma tímico está conformado por dos zonas bien definidas: la corteza (extensa y densa) que se caracteriza por la presencia de células epiteliales de la corteza tímica (CECT), y la médula (interna y menos densa) caracterizada por la presencia de células epiteliales de la médula tímica (CEMT)<sup>[1]</sup>. Las células epiteliales contribuyen a procesos distintos de la diferenciación y maduración de los linfocitos T. En la zona cortical ocurren los primeros estadios de maduración de las células T y el proceso de selección positiva y en la zona medular se efectúa el establecimiento de la autotolerancia de las células T por el mecanismo de selección negativa.



**Figura 1:** La organización celular del timo humano. El timo, que se encuentra en la línea media del cuerpo por encima del corazón, se compone de varios lóbulos, cada uno de los cuales contiene las regiones cortical discreta (exterior) y medular (centrales). Como se muestra en el diagrama de la izquierda, la corteza se compone de timocitos inmaduros (azul oscuro), células epiteliales corticales (azul claro), con las que los timocitos corticales inmaduros están estrechamente asociados, y macrófagos dispersos (amarillo), que están

implicados en la eliminación de los timocitos apoptóticos. La médula consiste en timocitos maduros (azul oscuro) y células epiteliales medulares (naranja), junto con los macrófagos (amarillo) y las células dendríticas (amarillo) que provienen de la médula ósea. Los corpúsculos de Hassall podrían ser también un sitio de destrucción celular. La fotografía a la derecha muestra la sección equivalente de un timo humano, haciendo una tinción con hematoxilina y eosina. La corteza es de coloración oscura, mientras que la médula se tiñe ligeramente. El cuerpo grande en la médula es un corpúsculo de Hassall. Adaptado del libro *Inmunobiología* de Janeway, Garland Science 2008. MO: médula ósea.

Durante el desarrollo embrionario del timo, las células epiteliales de la corteza surgen de las células ectodérmicas, en tanto que las medulares derivan de las células del endodermo, ambas forman un timo rudimentario llamado esbozo tímico, que luego es colonizado por las células que migran desde la médula ósea, que son los precursores linfoides de los timocitos, las células dendríticas y los macrófagos. Las fases tempranas del desarrollo tímico están caracterizadas por un rápido crecimiento, como resultado de una vigorosa proliferación y diferenciación de las células epiteliales tímicas y las células T<sup>[3]</sup>. En un timo de ratón adulto joven hay alrededor de  $1-2 \times 10^8$  timocitos. Por día se generan alrededor de  $5 \times 10^7$  células nuevas, sin embargo, sólo entre  $1-2 \times 10^6$  de estas células (entre un 2 a un 4%) abandonan el timo como células T maduras y el 98% restante muere por apoptosis dentro del órgano.

Los precursores tímicos (células madres pluripotentes hematopoyéticas diferenciadas en médula ósea) migran desde médula ósea (MO) e ingresan al timo a través de los vasos sanguíneos ubicados en la unión de la región cortical con la medular (unión cortico-medular) guiados por factores quimiotácticos secretados por este órgano y se dirigen hacia la zona cortical para comenzar su diferenciación. A medida que los timocitos maduran tienden a desplazarse progresivamente de forma radial desde la región subcapsular externa de la corteza hacia la corteza interna y la médula<sup>[4]</sup>.

El timo es un órgano muy importante en la función del sistema inmune, esto se ha evidenciado en estudios enfocados en el impacto que tienen las alteraciones en los genes relacionados al desarrollo tímico y la producción de células T. Por ejemplo en algunos casos, tanto en humanos como roedores, donde hay una deficiencia en el gen *Foxn1* (Forkhead Box N1), factor de transcripción involucrado en la síntesis de queratina y regulador del desarrollo, diferenciación y función de las CECT, el tejido tímico no se desarrolla adecuadamente en el estadio embrionario generando así la pérdida de la inmunidad mediada por las células T y a largo plazo una inmunodeficiencia severa<sup>[5]</sup>. También, sufre alteraciones al censar cambios provocados por factores intrínsecos y

extrínsecos como: estados fisiológicos de la pubertad y el embarazo, enfermedad, timoma, inflamación, condiciones psicológicas, infecciones bacterianas y virales, el estrés, las condiciones ambientales, la terapia con corticosteroides, entre muchos otros más<sup>[6]</sup>.

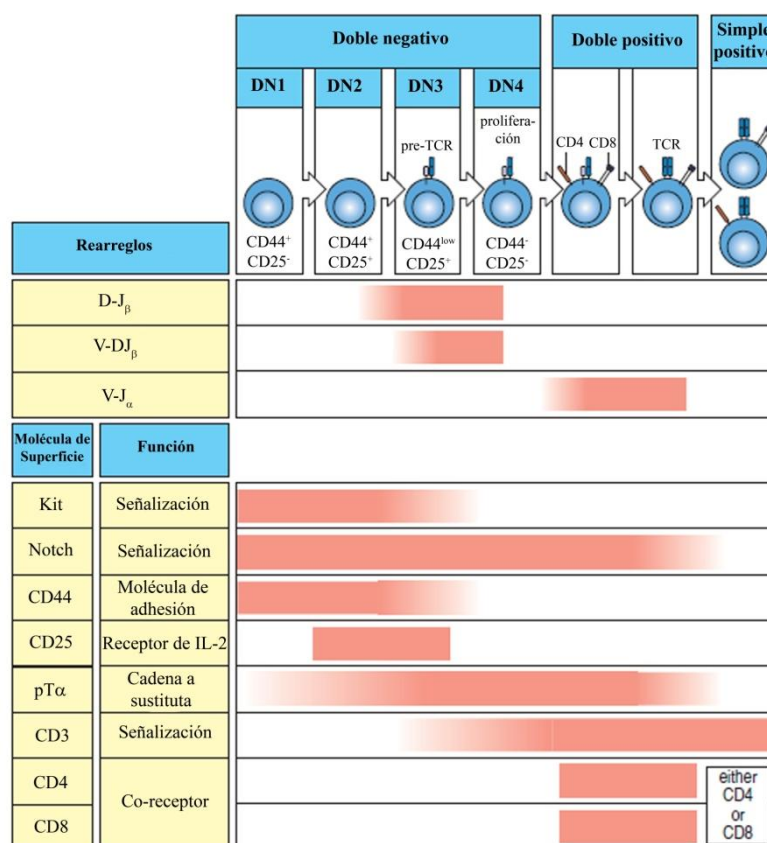
Por otro lado, el timo presenta su máxima actividad en la juventud y se va atrofiando con la edad. Este proceso de degeneración se conoce como involución tímica y lo que ocurre es una progresiva pérdida del tejido linfático y atrofia de la zona cortical y medular que se van reemplazando por tejido graso. Disminuye la exportación de células T, pero no hay una pérdida total de la funcionalidad tímica y además es un fenómeno que puede revertirse<sup>[6, 7]</sup>.

## **DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS T CONVENCIONALES EN TIMO**

### Eventos moleculares que sufren los timocitos durante su diferenciación y microambiente tímico

Durante el desarrollo tímico, los progenitores tempranos de células T llegan al timo a través del torrente sanguíneo, ingresan por las vénulas post capilares cercanas a la unión cortico-medular y sufren una serie de procesos de migración, proliferación y diferenciación en el timo antes de ser exportadas a la circulación como células T maduras.

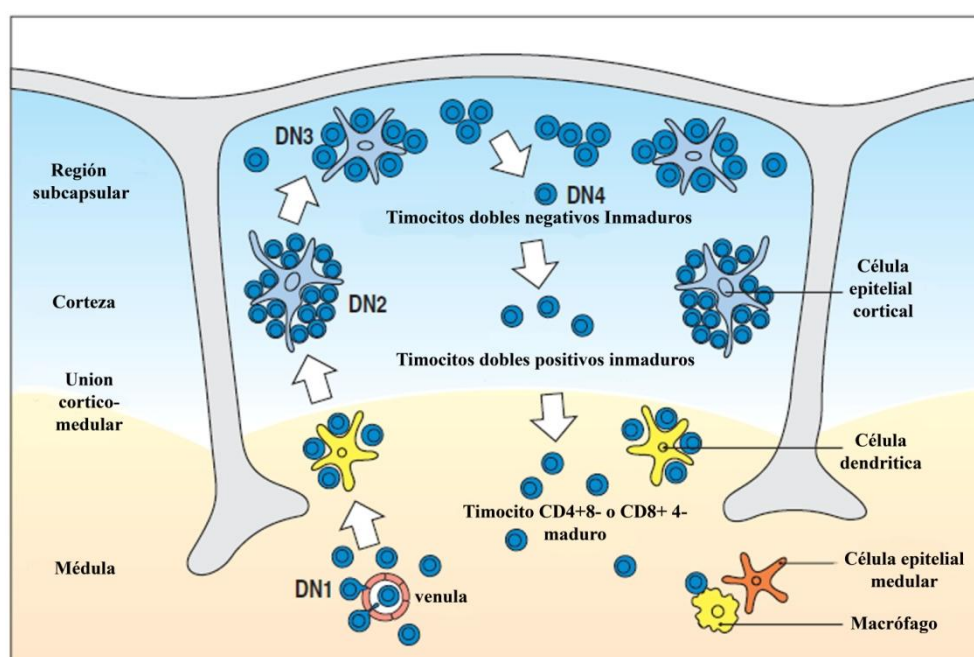
Cuando las células precursoras de las células T ingresan al timo, en la zona cortical, interaccionan con el estroma tímico y comienzan a expresar moléculas características del linaje T como el CD2 y el antígeno de timocitos Thy1. Los precursores son denominados timocitos dobles negativos (DN) basándose en la ausencia de la expresión de los co-receptores CD4 y CD8, y se diferencian en 4 estadios (DN1, DN2, DN3 y DN4) en función de la expresión de la molécula CD44 y CD25, como se muestra en la figura 2.



**Figura 2:** Correlación entre las etapas de desarrollo de las células T $\alpha\beta$  en el timo de ratón, con el programa de reordenamiento de genes y la expresión de proteínas en la superficie celular. Figura adaptada del libro Immunobiología de Janeway, Garland Science 2008.

En el estadio DN1 las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor de las células T (TCR) se encuentran en configuración de línea germinal por lo cual estas células son negativas para la expresión del TCR. Durante la transición del estadio DN1 hacia el DN2 comienzan los rearreglos de la cadena  $\beta$  del TCR mediados por las enzimas de recombinación-activación génicas RAG1 y RAG2 y finalizan en el estadio DN3. La expresión del pre-TCR junto con la molécula CD3 que provee los componentes de señalización del receptor, que forman un complejo en la superficie de los timocitos DN3, induce la transición hacia el estadio DN4. En este estadio ocurre una rápida proliferación que conlleva al incremento en la expresión de los co-receptores CD4 y CD8 y el rearreglo de la cadena  $\alpha$  del TCR generando los timocitos dobles positivos (DP) que son la subpoblación mas abundante dentro del timo. Los timocitos DP al expresar el TCR en su superficie interaccionan con auto-antígenos (auto-Ags) presentados por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I o II (CMH-I y CMH-II respectivamente) expresadas sobre la superficie de las CECT. Aquellos timocitos que reciben una fuerte estimulación de la señal del TCR o que no

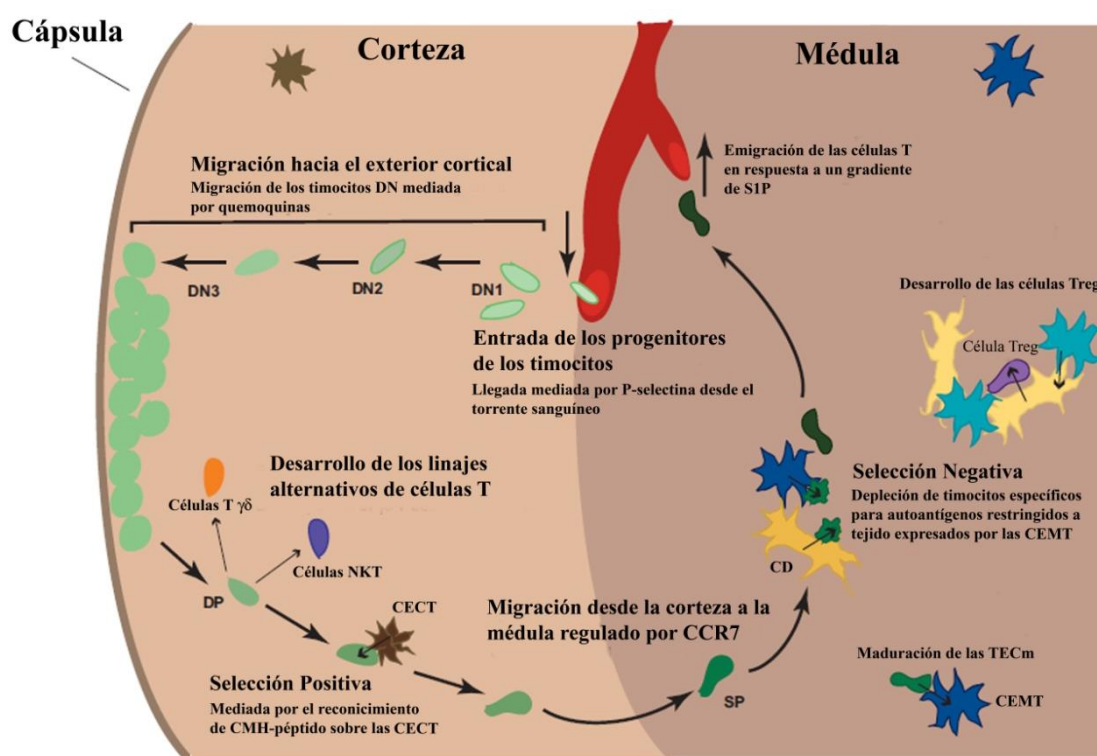
reconocen los complejos de CMH-Ag propio son eliminados en la corteza, mientras que los que reciben baja señal sobreviven y maduran convirtiéndose en una célula T simple positiva (SP) CD4 o CD8 y migran hacia la zona medular del timo, este proceso se conoce como selección positiva. Ya en la zona medular ocurre la selección negativa que consiste en la eliminación de las células T que poseen un TCR con una afinidad alta o inapropiada hacia los Ags propios expresados sobre las CEMT. Este proceso de tolerancia central limpia el repertorio de células T de aquellos clones potencialmente autoreactivos. Alrededor del 2% de los timocitos DP sobreviven a ambos procesos de selección tímica y se convierten en células T SP maduras que van a ser exportadas del timo hacia los órganos linfáticos secundarios (OLS) para formar el repertorio de células T en periferia (Figura 3)<sup>[4]</sup>. Algunos de los timocitos SP CD4 que presentan un TCR con afinidad intermedia por algunos auto-Ags se diferencian a células T regulatorias (Treg)  $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$  que están involucradas en la tolerancia periférica<sup>[8]</sup>.



**Figura 3:** Los timocitos en diferentes etapas de desarrollo se encuentran en distintas partes del timo. Los timocitos precursoros tempranos entran en el timo desde el torrente sanguíneo a través de las vénulas de epitelio alto cerca de la unión córtico-medular. A medida que estas células se diferencian van migrando a través de las distintas zonas del timo (flechas blancas), hasta alcanzar el estadio final de maduración, que es cuando son exportadas hacia los OLS. Adaptado del libro *Inmunobiología* de Janeway, Garland Science 2008.

Cuando los timocitos están maduros migran hacia los OLS guiados por ciertas señales. En este caso ocurre la interacción entre el receptor acoplado a la proteína G  $S1P_1$

(receptor de esfingosina 1-fosfato tipo 1), ubicado sobre los timocitos maduros, con su contraparte S1P (esfingosina 1- fosfato) que se encuentra en grandes concentraciones en la sangre y linfa y en bajas concentraciones en timo. Es decir, que el gradiente de S1P que se genera entre el timo y la sangre media la exportación de los timocitos maduros. Otra molécula que también está involucrada es el receptor de lectinas tipo C, CD69, cuya expresión disminuye en los timocitos maduros antes de que salgan del timo y su sobre-expresión genera la retención de los mismos en la médula tímica (Figura 4)<sup>[9]</sup>.



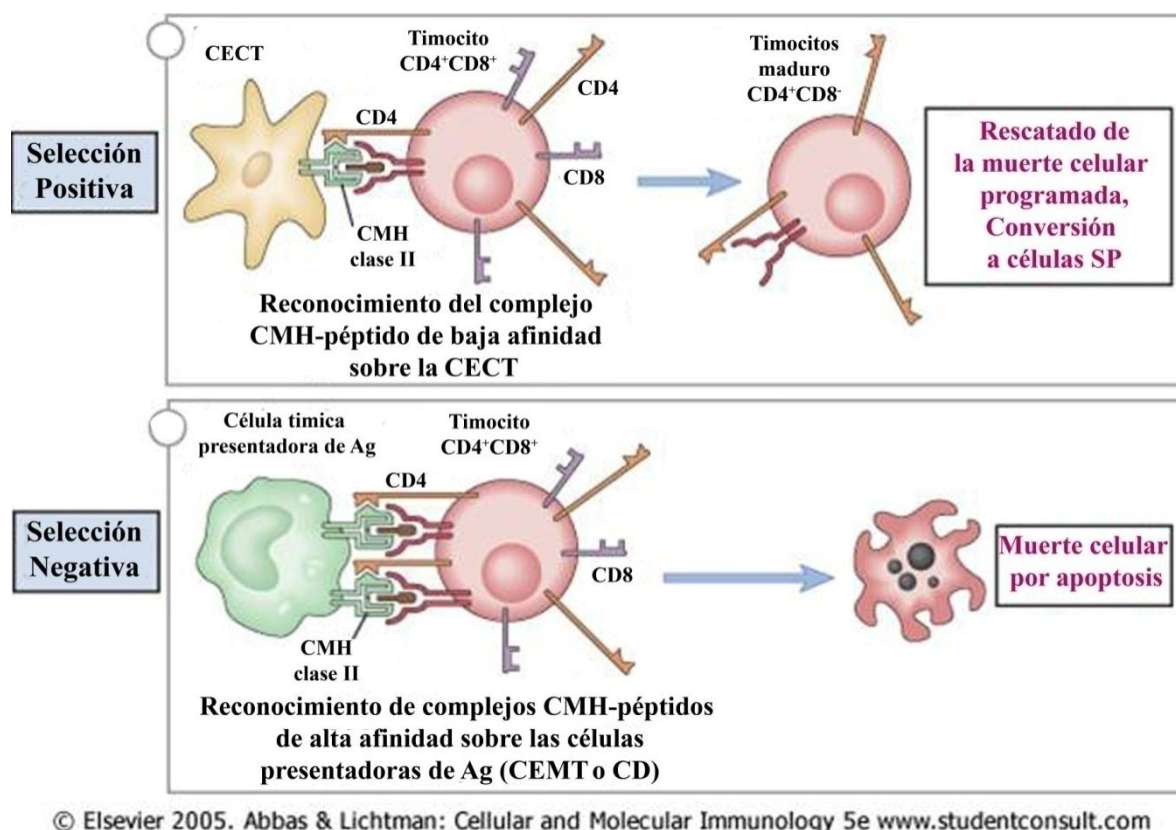
**Figura 4:** Compartimentalización del timo. Los timocitos maduros (verdes) van migrando (flechas gruesas) a lo largo de la corteza y de la médula a través de interacciones que inducen señalización (flechas finas). Los progenitores hematopoyéticos, guiados por la señal de P-selectina, entran al timo a través del torrente sanguíneo por las vénulas post-capilares y migran hacia la corteza en respuesta a señales mediadas por quimiocinas. En la corteza, los timocitos sufren la selección positiva sobre las CECT (marrones). Los timocitos seleccionados positivamente migran hacia la médula en respuesta a la señal de CCR7. Una vez en la médula, los timocitos SP sufren la selección negativa por auto-antígenos restringidos a los tejidos expresados sobre las CEMT (azul) y células dendríticas (CD, amarillo). Los timocitos SP maduros también promueven la maduración de las CEMT. Las CD y CEMT cooperan para promover el desarrollo de las células Treg. Las células T maduras salen del timo a través de los vasos sanguíneos o linfáticos en respuesta a un gradiente de S1P. Figura adaptada del trabajo de Ena Ladi y col, Nature immunol, 2006.



### Selección positiva y negativa: Tolerancia central

Las CET regulan el desarrollo de los timocitos presentando auto-Ag en su superficie que evalúan la autoreactividad de los timocitos en desarrollo, antes de instruirlos para sobrevivir o morir. Las interacciones recíprocas entre estas poblaciones son críticas para el normal desarrollo de ambos compartimientos ya que las CET presentan auto-Ag para promover el desarrollo de los timocitos y estos últimos secretan factores necesarios para el desarrollo del compartimiento epitelial constituyendo un proceso dinámico de comunicación tímica (“cross-talk”). A su vez las células epiteliales secretan citoquinas importantes para el mantenimiento y supervivencia de los timocitos como la interleucina 7 (IL-7)<sup>[10]</sup>.

Durante el desarrollo, cuando el timocito culmina los re-arreglos génicos y expresa el TCR en su superficie, formando un complejo con la molécula CD3 y uno de los co-receptores CD4/CD8, es sometido a un proceso de selección positiva. Durante este proceso, las CET le presentan auto-Ags en el contexto de CMH tipo I o II (CMH-I o CMH-II respectivamente) que regula la diferenciación de un pequeño porcentaje de timocitos inmaduros a una célula T madura. Estas células T expresan un diverso repertorio de TCR capaces de reconocer una amplia variedad de Ag propios y extraños. Cuando los timocitos que reciben la señal de supervivencia en la corteza migran hacia la médula tímica son educados para no atacar a los tejidos propios del cuerpo a través del proceso de selección negativa. Durante este último proceso, las células T que expresan un TCR que tiene una alta o inapropiada especificidad por Ags propios presentados por las CET son eliminados por apoptosis. La combinación de Ags que presentan las CET junto a las CET dan lugar a un repertorio de células T diverso e inmunocompetente, en donde se han eliminado principalmente las células T autoreactivas (Figura 5).



**Figura 5:** Procesos de selección en el timo. En la selección positiva, si el TCR del timocito interactúa con baja afinidad con el complejo péptido-CMH propio presentado por las CECT, no muere por apoptosis y continúa su proceso de maduración. En la selección negativa, si el TCR del timocito interactúa con alta afinidad con el complejo péptido-CMH propio presentado por CEMT o CD, se induce su muerte celular por apoptosis. Figura adaptada del libro de Abbas y Lichtman: Inmunología Celular y Molecular 5ª edición, 2005.

### MADURACIÓN POST-TÍMICA: RECIENTES EMIGRANTES TÍMICOS (RTE)

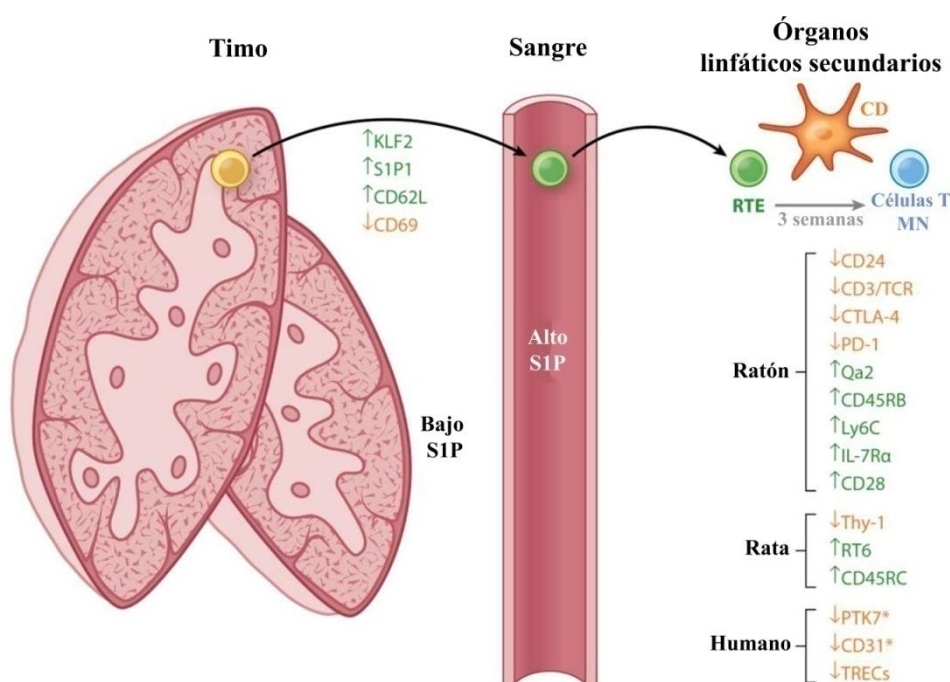
Los recientes emigrantes tímicos (RTE) son una población de células T convencionales que han completado recientemente su maduración intratímica y han salido hacia la periferia. Esta población es relevante ya que constituye una proporción considerable del grupo de células T en los neonatos, niños y adultos jóvenes<sup>[11, 12]</sup>.

Como se mencionó anteriormente en la sección de desarrollo de los timocitos, entre el 1- 5% de los timocitos sobreviven a los procesos de selección tímica y se encuentran en la médula tímica antes de su egreso. En ella permanecen durante 2 días para incrementar la expresión del factor de transcripción tipo Krüppel 2 (KLF2) que a su vez provoca la expresión del receptor S1P1 que por interacción con su ligando S1P liberado, por los pericitos, les permite salir hacia la periferia (Figura 6)<sup>[11, 12]</sup>.

Este mecanismo es regulado de manera negativa por la expresión de la molécula CD69 en la superficie del timocito. La migración a través del endotelio vascular toma alrededor de 3 minutos y aproximadamente un millón de timocitos maduros se exporta hacia la periferia en un ratón adulto joven<sup>[11]</sup>.

Los RTE se pueden identificar tanto en animales como en humanos porque expresan un grupo de moléculas diferentes a las que expresan las células T más maduras en periferia. En roedores por ejemplo, por distintos estudios de inyección intratímica de un colorante o utilizando animales transgénicos RAG2-GFP, se ha determinado que los RTE tienen una baja expresión de la molécula Qa2 y una alta expresión de CD24 ( $Qa2^{lo}$   $CD24^{hi}$ ) comparado con las células T más maduras periféricas que son  $Qa2^{hi}$   $CD24^{lo}$ . La molécula Qa2 es una de las moléculas del CMH de clase Ib, no clásicas y el CD24 es una proteína que se expresa en las células T no activadas y se pierde su expresión al activarse la célula (Figura 6). Luego de tres semanas los RTE sufren una serie de cambios que los lleva a la disminución de la expresión de CD24 y el incremento Qa2, el receptor de IL-7 (IL-7R), CD45RB y la molécula co-estimuladora CD28, entre otras moléculas. Estos cambios ocurren por interacción con el estroma de los órganos linfáticos secundarios (OLS)<sup>[11, 12]</sup> y por ende la célula adquiere un fenotipo maduro.

La importancia de los RTE en el mantenimiento de la diversidad de células T vírgenes es clara ya que varios estudios en ratones demuestran que cuando se interrumpe la exportación tímica se observa una disminución del repertorio de células T<sup>[11]</sup>.



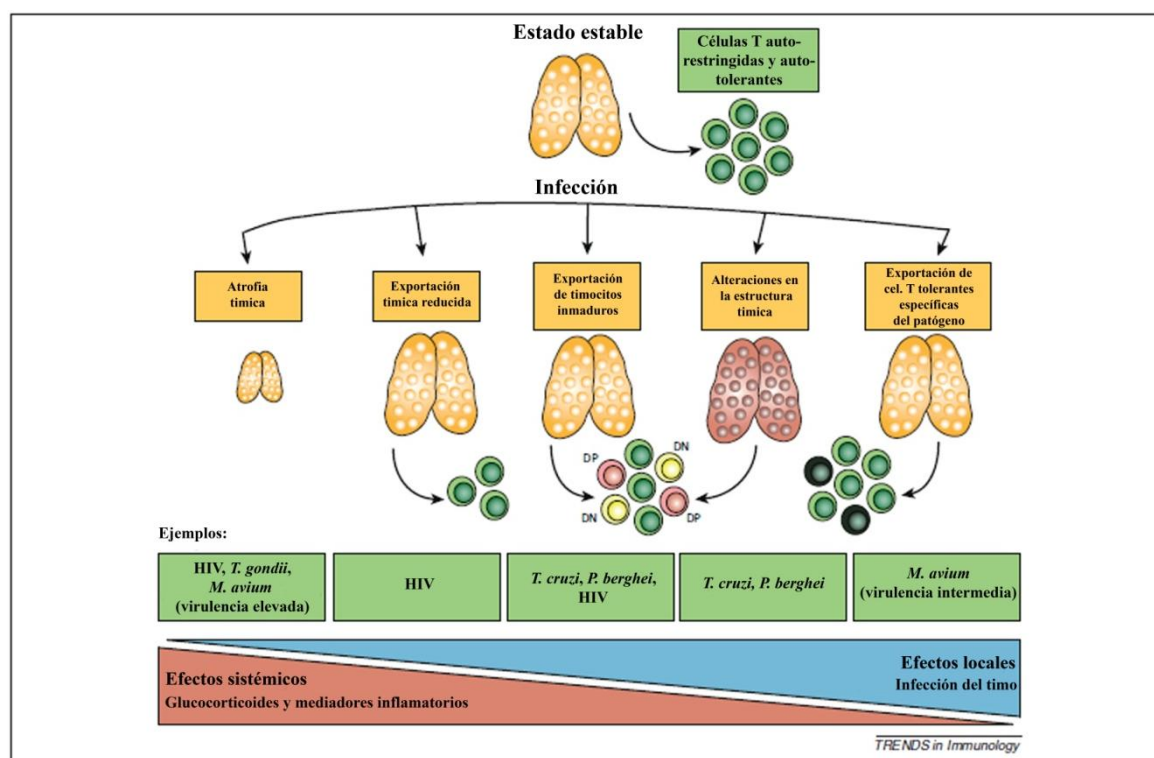
**Figura 6:** Diagrama del egreso tímico y la maduración fenotípica de los RTE en ratón, rata y humanos en los OLS. Los pre-RTE maduros (célula amarilla) aumentan la expresión de KLF2, S1P1 y CD62-L, disminuyen la expresión de CD69 y salen del timo por la unión cortico medular, migrando hacia un mayor gradiente de S1P para entrar en el torrente sanguíneo. Los RTE (célula verde) salen de la sangre y entran en los órganos linfáticos secundarios y luego de 3 semanas de maduración, proceso facilitado por las células dendríticas (células naranja), eventualmente se convierten en células T vírgenes pero maduras (MN) (célula azul). La maduración se asocia con cambios en los distintos factores que se muestran en la figura según la especie. Figura adaptada del trabajo de Fink PJ, Annu. Rev. Immunol. 2013.

## **ALTERACIONES EN EL TIMO LUEGO DE PROCESOS INFLAMATORIOS/INFECCIOSOS**

El estudio de las enfermedades infecciosas se ha focalizado principalmente en la respuesta inmune efectora, los cambios que ocurren en sangre y en los OLS. Mientras que los estudios a nivel tímico han sido escasos y es un terreno poco explorado.

Como mencionamos previamente, el timo es requerido para la diferenciación de las células T y este proceso depende de los antígenos que se presentan a los timocitos, del microambiente alrededor de las células en diferenciación y de la arquitectura del timo. Todas estas variables se encuentran afectadas cuando ocurre una infección ya sea local o por efectos sistémicos impulsados por los mediadores inflamatorios que acompañan a una infección sistémica. Anteriormente se creía que el timo era un sitio inmunoprivilegiado al cuál no tenían acceso los patógenos ni las células que circulan desde los OLS, sin embargo, ahora se ha descrito que durante condiciones infecciosas/inflamatorias hay un incremento en la recirculación de células desde la periferia hacia el timo<sup>[13]</sup> y que en algunas situaciones particulares cuando un patógeno se encuentra allí puede haber migración de células Ags específicas hacia este tejido. Por lo tanto, es muy importante que se resuelva la infección en el timo ya que la persistencia crónica de los microbios puede afectar la diferenciación de células T específicas del patógeno y disminuir la resistencia a la infección<sup>[14-16]</sup>. Los patógenos pueden irrumpir en la estructura y función tímica y alterar la selección y exportación de las células T. Estos cambios afectan el conjunto de células T en la periferia y el desarrollo de futuras respuestas inmunes. La magnitud de las consecuencias depende del tipo de microbio, la severidad de la infección y la habilidad del patógeno de infectar y persistir dentro del timo<sup>[17-19]</sup>.

Existen dos maneras por las que una infección puede afectar al timo: local y sistémica (Figura 7). Local se refiere a las consecuencias de la infección en el timo y la sistémica ocurre por los factores solubles como los glucocorticoides y citoquinas inflamatorias liberadas al torrente sanguíneo. Estos mediadores pueden generar atrofia tímica que es una consecuencia común en infecciones por hongos, bacterias, parásitos y virus.



**Figura 7:** Efectos de la infección en el timo por distintos microorganismos. Esquema que representa como una infección puede afectar al timo a través de efectos locales o sistémicos. La infección induce alteraciones como atrofia tímica, modificaciones en la estructura del timo, y alteraciones en las células T que se exportan a periferia. Los cuadros verdes presentan ejemplos de patógenos que provocan los diferentes cambios en el timo. Abreviaciones: DN timocitos doble negativos, DP timocitos doble positivos. Figura adaptada del trabajo de Cláudio Nunes-Alves y col, Cell TREIMM, 2013.

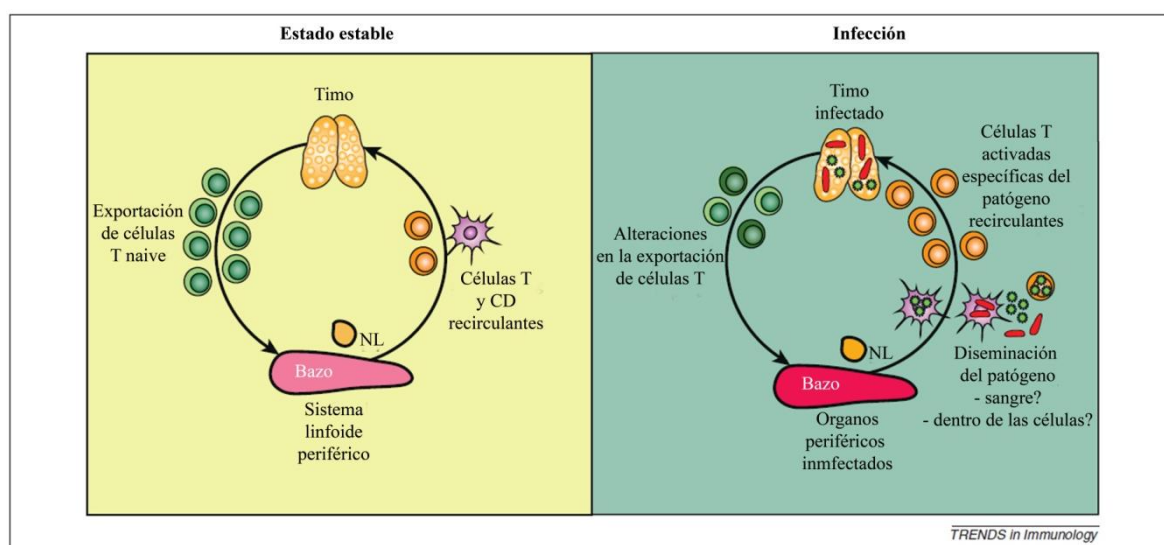
Los glucocorticoides provocan la apoptosis de los timocitos DP y en algunos casos pueden tener un efecto sinérgico con otros mediadores como, por ejemplo, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) en infecciones con *T. cruzi*<sup>[20]</sup> o con interferón gama (IFN $\gamma$ ) y oxido nítrico en infecciones con *Mycobacterium avium*<sup>[21]</sup>, entre otros.

La infección local puede exacerbar la atrofia tímica a través de la remodelación de la matriz extracelular, la producción de factores de virulencia o la infección directa de las

células tímicas, como es el caso de *T. cruzi* que infecta tanto macrófagos como células epiteliales tímicas afectando su función<sup>[14]</sup>. Estos cambios estructurales pueden incidir en el proceso de exportación de las células T, particularmente provocando la liberación de células T inmaduras (DP o DN) o auto-reactivas hacia los OLS que puedan generar autoinmunidad, como así también se puede ver afectada la selección tímica induciendo tolerancia contra los patógenos invasores<sup>[16]</sup>.

El impacto de la disfunción tímica en la inmunidad puede ser limitado si en el conjunto de células T en la periferia se encuentran células pre-existentes específicas del patógeno. Mientras que puede tener repercusiones severas particularmente en: infecciones adquiridas durante la niñez cuando el repertorio de células T todavía está en desarrollo; en infecciones persistentes (por ejemplo tuberculosis) en donde se induce tolerancia de células T; y en infecciones severas asociadas a linfopenia, como HIV, en donde se requiere de la reconstitución del repertorio inmune. En todos estos casos el escenario puede favorecer la persistencia del patógeno<sup>[16]</sup>.

La pregunta de cómo llegan los microorganismos al timo, tiene dos posibles respuestas. La primera es que los patógenos pueden entrar al timo por la circulación sanguínea e infectar las células blanco. La segunda, apela a un modelo conocido como “caballo de Troya” en el que células infectadas desde la periferia ingresan al timo con el patógeno en su interior y provocan su esparcimiento dentro del mismo (Figura 8). Por otro lado, la vía de recirculación también puede permitir el ingreso de células específicas para el patógeno para favorecer su eliminación<sup>[16]</sup>.



**Figura 8:** Respuesta inmune en el timo. Representación esquemática de la diseminación de los microbios y el reclutamiento de células específicas del patógeno al timo. Bajo condiciones normales, las células T maduras y las CD circulan desde los órganos linfáticos secundarios hacia el timo (panel izquierdo). Bajo infección, el patógeno se disemina desde la periferia hacia el timo de manera extracelular o dentro de las células recirculantes. El timo infectado produce quimiocinas que reclutan células T específicas de antígeno, que expresan los receptores para dichas quimiocinas, desde los tejidos periféricos para combatir la infección (panel derecho). Abreviaturas: NL nódulos linfáticos, CD células dendríticas. Figura adaptada del trabajo de Cláudio Nunes-Alves y col, Cell TREIMM, 2013.

Entre los mediadores inflamatorios que son liberados de manera sistémica durante el curso de infecciones o inflamaciones de tipo Th1 se encuentran las citoquinas IL-12 e IL-18. Ambas son liberadas por las CD, macrófagos (Ma), entre otras células de la inmunidad innata e inducen la activación y liberación de IFN $\gamma$ , actuando de manera sinérgica, en los linfocitos T a través de sus receptores de superficie IL-12R e IL-18R respectivamente. Cuando ambas subunidades de la IL-12 se unen a su receptor se activan cascadas de señalización intracelular que generan el incremento en la expresión de IL-18R y viceversa. Esta inducción de IFN $\gamma$  se da de una manera independiente de la estimulación antigénica a través del TCR, es decir, que las células T también pueden activarse por una vía alternativa mediada por las señales de las citoquinas. A su vez, la IL-18 es capaz de incrementar la acción citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y las células NK. Teniendo en cuenta que el IFN $\gamma$  es una de las citoquinas mejor caracterizadas e importantes que contribuyen en la defensa del organismo, las citoquinas que medien su liberación también deben jugar un rol clave en la defensa del hospedador<sup>[22-25]</sup>.

En diversos estudios se demostró que las citoquinas de tipo Th1 como IL-12 e IL-18, al ser liberadas durante el desarrollo intratímico en ausencia de antígeno, son capaces de polarizar la diferenciación de las células T y modular su desarrollo, como así también influenciar en el microambiente tímico modificando la expresión de las moléculas CMH sobre las CECT y CEMT<sup>[28-31]</sup>. Timocitos aislados de animales y cultivados *in vitro* con distintas dosis de IL-12 mas IL-18 (incluso concentraciones menores a las que son producidas en ciertas infecciones microbianas como la infección con *T. cruzi*<sup>[26]</sup> o con *Candida albicans*<sup>[27]</sup>, pueden producir una gran cantidad de IFN $\gamma$  independientemente de cualquier otro estímulo externo<sup>[28-31]</sup>. Esto se debe a que cada célula virgen es inmunológicamente pluripotente y posee la capacidad de diferenciarse a distintos y múltiples subtipos celulares. Por lo tanto, factores como el grado de activación antigénica, el tiempo de contacto con la célula presentadora de antígeno, la división asimétrica y las condiciones

ambientales a su alrededor, incluyendo las citoquinas, tienen un gran influencia en el desarrollo de los timocitos<sup>[32]</sup>. Esto también puede afectar el desarrollo de la respuesta inmune en periferia ya que parte de los timocitos que son exportados desde el timo ya presentan una diferenciación hacia un perfil inflamatorio.

Por todo lo expuesto anteriormente, podemos decir que es importante preservar la integridad tímica que sostenga una diferenciación y exportación óptima de células T y prevenga la generación de tolerancia a los patógenos invasores. Por lo tanto, el timo cumple un rol activo durante las infecciones y contribuye a la adecuada respuesta inmunológica frente a las mismas.

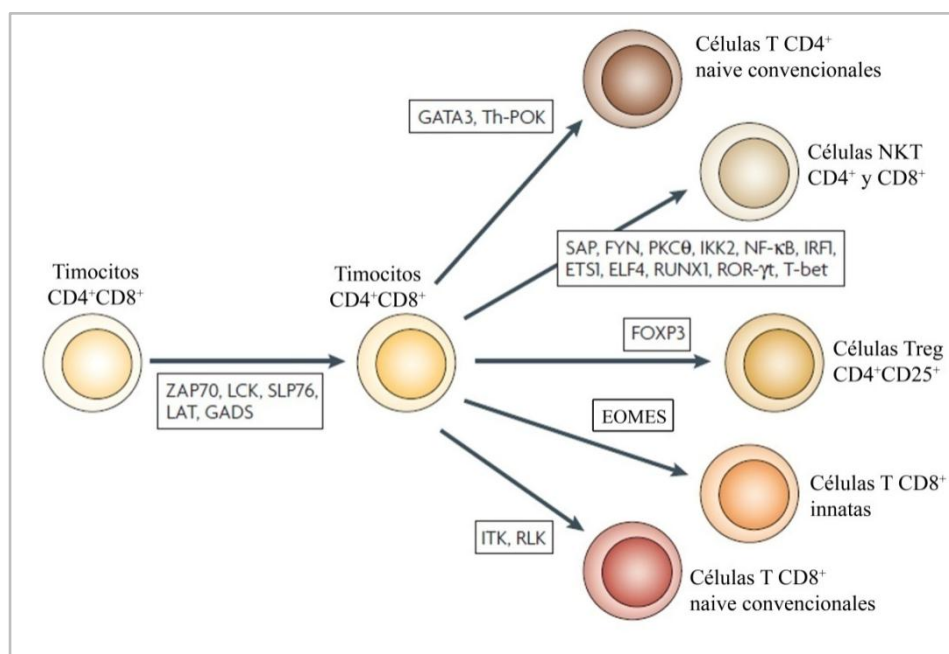
### **CÉLULAS T CD8 INNATAS**

El desarrollo tímico produce una amplia variedad de subtipos de células T que varían en las funciones que cumplen en la respuesta inmune. Los timocitos convencionales CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> requieren de una activación prolongada, mediada por la unión de los complejos CMH-péptido con el TCR y la co-estimulación generada por la interacción de las moléculas CD28 sobre la células T con B7 sobre la célula presentadora de antígeno (CPA), y de un proceso de diferenciación para adquirir funciones efectoras de protección. Por otro lado, también se generan en timo otros subtipos de células T denominadas “Células Innatas” que derivan, al igual que las convencionales, de un timocito DP (Figura 8). Se las llama de esta forma porque presentan un fenotipo de memoria y al ser estimuladas producen rápidamente una gran cantidad de citoquinas. Están restringidas a moléculas de CMH-Ib no clásicas que tienen una limitada distribución y polimorfismos en los tejidos: CD1d, Qa1, Qa2, H2-M3 y MR-1. Entre éstas se encuentran las células T $\gamma\delta$ , NKT invariantes (iNKT) que reconocen en el contexto de CD1d, células T invariantes asociadas a las mucosas (MAIT) que reconocen en el contexto de MR-1, células T CD8<sup>+</sup> que reconocen en el contexto de H2-M3, entre otras. Todas ellas dependen de interleuquina 15 (IL-15) para su desarrollo y de la vía de señalización de la molécula de activación (SLAM) asociada a la proteína adaptadora (SAP) junto con la interacción de B7-CD28 para su maduración funcional. Este subtipo de células presentan un repertorio restringido de TCR<sup>[33, 34]</sup>.

En los últimos años se han descrito dos nuevos subtipos de células innatas que se desarrollan en timo. Por un lado, se encuentran las células T CD8<sup>+</sup> innatas que se desarrollan en animales con diferentes deficiencias genéticas en ciertas quinasas involucradas en la vía de señalización del TCR<sup>[33, 34]</sup> y por otro lado, las células T CD4<sup>+</sup> que expresan la proteína



promielocítica de leucemia dedos de zinc (PLZF) que se generan por interacción con otros timocitos dependiente de CMH-II<sup>[35]</sup>. Ambos subtipos celulares, a diferencia de las descritas en el párrafo anterior, presentan una gran diversidad en el repertorio de TCR al igual que las células T convencionales<sup>[36, 37]</sup>.



**Figura 9:** Múltiples linajes de células T maduras que se desarrollan a partir de progenitores DP regulados por la expresión de los distintos factores de transcripción que se detallan en cada una de las flechas del diagrama. Figura adaptada del trabajo de Leslie Berg, Nature, 2007.

### Desarrollo de las células T CD8 innatas en timo y sus características

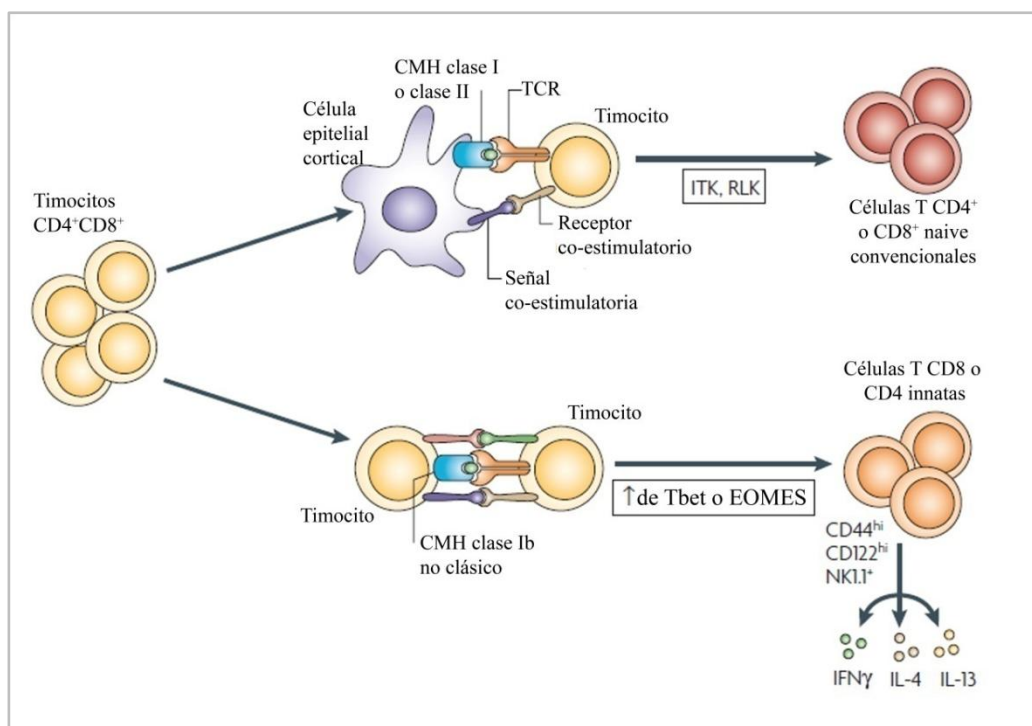
Se ha descrito recientemente que la deficiencia en diferentes proteínas asociadas a la señalización del TCR como la quinasa inducible por IL-2 de células T (Itk)<sup>[33]</sup>, el factor de transcripción tipo Krüppel 2 (KLF2)<sup>[38]</sup>, la quinasa de arresto de linfocitos (RLK)<sup>[39]</sup>, entre otras, altera el desarrollo convencional de las células T CD8<sup>+</sup> en el timo y en bazo. En ratones con estas deficiencias, la mayoría de los timocitos SP CD8<sup>+</sup> presentan un fenotipo similar al de memoria (CD24<sup>lo</sup>CD44<sup>hi</sup>CD122<sup>hi</sup>) y producen rápidamente IFN $\gamma$  al ser estimulados. Lo que aún no se sabe es como la deficiencia de todas estas proteínas converge en un mismo fenotipo de células CD8<sup>+</sup> <sup>[34, 40]</sup>. Además, en estas células la expresión del factor de transcripción eomesodermina (EOMES), de la familia T-box, regula los mecanismos efectores incluyendo la expresión de CD122 o cadena  $\beta$  del receptor de IL-2 e

IL-15 y la secreción de citoquinas como  $\text{IFN}\gamma$ . Las células T  $\text{CD8}^+$  innatas muestran un gran incremento en la expresión de Eomes durante su proceso de maduración en timo, por lo cual se lo utiliza como un marcador de este linaje. Sin embargo, a diferencia de las células T convencionales, las innatas tienen una disminuida expresión del factor de transcripción Tbet<sup>[36]</sup>.

Un dato interesante que también se ha reportado es que alrededor de un 10% de los timocitos  $\text{CD8}^+$  en animales normales (WT) son células T innatas<sup>[37]</sup> y que también están presentes en humanos, en sangre de cordón umbilical por ejemplo<sup>[41]</sup>.

Las células T innatas comparten rasgos comúnmente asociados a las células T de memoria convencional como una alta expresión de marcadores de activación como CD44, CD122 y la dependencia, para su desarrollo y mantenimiento, de IL-15. Expresan constitutivamente factores de transcripción que regulan diversos genes, entre los cuales el más importante es EOMES. La mayoría de las células innatas a diferencia de las convencionales, presentan TCR específicos para moléculas de CMH clase Ib no clásicas, en lugar de moléculas CMH I clásicas<sup>[40, 42]</sup>.

Son seleccionadas en timo por interacciones con moléculas de CMH expresadas sobre células hematopoyéticas derivadas de médula ósea, como otros timocitos o células B, en lugar de moléculas expresadas sobre las células epiteliales (Figura 8)<sup>[40, 43-45]</sup>.



**Figura 10:** Modelo propuesto de los distintos requerimientos para el desarrollo de las células T convencionales versus las innatas. Figura adaptada del trabajo de Leslie Berg, Nature, 2007.

Por otro lado, los estudios de las células CD8<sup>+</sup> innatas que se encuentran en la periferia son controversiales. Se ha reportado que en OLS de animales C57BL6 se encuentran células CD8<sup>+</sup> con fenotipo de memoria a las que se las denomina “células T CD8<sup>+</sup> tipo de memoria” o células de “memoria virtual” que no han contactado con el Ag previamente [46, 47]. Las mismas, a diferencia de las innatas de timo, presentan incrementada expresión tanto de EOMES como de Tbet. Mientras que en los animales de la cepa BALB/c las células innatas tanto de timo como de OLS, tienen características similares. Por otro lado, en ambas cepas se ha descrito que, al igual que las células CD8<sup>+</sup> innatas de timo, las que se encuentran en periferia son dependientes de IL-4 para su desarrollo y la adquisición del fenotipo activado de memoria (CD44<sup>hi</sup>CD122<sup>hi</sup>EOMES<sup>+</sup>) [46, 47].

Un dato relevante es que se cree que las células innatas podrían participar como primera línea de defensa en distintas infecciones por su capacidad de ejercer una función efectora inmediata, mientras se va generando la respuesta inmune adaptativa. Además pueden proveer citoquinas, quimiocinas y otros factores en la fase temprana de la respuesta inmune que podrían influenciar y/o ayudar al impulso de la respuesta inmune adaptativa.

Las características que diferencian a las células T innatas de las convencionales se encuentran resumidas en la tabla 1 [40].

**Tabla 1:** Distintas características de las células T convencionales versus las células T TCRαβ<sup>+</sup> innatas. Adaptada del trabajo de Leslie Berg, Nature, 2007.

Características	Células T convencionales	Células T innatas
Fenotipo de superficie	Naive (CD44 <sup>low</sup> , CD122 <sup>low</sup> NK1.1 <sup>-</sup> )	Memoria (CD44 <sup>hi</sup> , CD122 <sup>hi</sup> NK1.1 <sup>+</sup> )
Especificidad del TCR	Moléculas CMH clase I o clase II clásicas	Moléculas CMH clase Ib no clásicas
Selección tímica	Seleccionadas por interacciones con células epiteliales tímicas	Seleccionadas por interacciones con células derivadas de médula ósea
Función efectora	No	Si
Expresión de factores de transcripción que regulan moléculas efectoras	No	Si
Dependencia de IL-15	No	Si *

\* Para el subtipo de células innatas que han sido estudiadas. IL-15, Interleukina 15; TCR, Receptor de la célula T

### Rol de IL-4 en el desarrollo de las células T CD8<sup>+</sup> innatas

La IL-4 es una citoquina que señala a través de un receptor que comparte una cadena común  $\gamma$  y que regula la diferenciación de los linfocitos T vírgenes CD4<sup>+</sup> hacia el subtipo T colaborador de tipo 2 (Th2), los cuales son esenciales para la inmunidad contra parásitos extracelulares, e inhiben la producción de IFN $\gamma$  y la respuesta de tipo colaborador 1 (Th1). Por otro lado, también se ha demostrado que es importante en la regulación de la respuesta de células T CD8<sup>+</sup> durante infecciones bacterianas y parasitarias y también se requiere para el desarrollo de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> innatos. La IL-4 induce la expresión del factor de transcripción EOMES en las células T CD8<sup>+</sup> innatas con la cooperación de las vías de señalización dependientes del factor transductor y activador de la transcripción 6 (STAT-6) y la proteína quinasa B (Akt o PKB)<sup>[36, 48]</sup>.

En los modelos animales deficientes de I $\kappa$ k, KLF2, entre otros, se observó una gran producción de IL-4 en timo y la misma estaba mediada por el incremento en una población particular de células que expresaban PLZF, entre las cuales se encuentran: las células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> con fenotipo de memoria (células T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> PLZF<sup>+</sup>)<sup>[33, 36]</sup>, las células iNKT o las células T $\gamma\delta$ <sup>[38]</sup>.

### Función de las células T CD8<sup>+</sup> innatas

Las células T de memoria convencionales se desarrollan en el timo a partir de células T vírgenes y adquieren el fenotipo activado en periferia cuando ocurre el reconocimiento de Ags extraños a través de su TCR en un contexto inflamatorio como puede ser una infección. Las células T CD8<sup>+</sup> innatas son fenotípicamente similares a las células T de memoria pero no requieren de la experiencia previa con el Ag específico para adquirir el fenotipo activado/memoria caracterizado por la expresión de CD44 (células T CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>) y se desarrollan en timo de manera dependiente de IL-4. Actualmente hay nuevas evidencias sobre el rol de las células innatas en las infecciones primarias como sensores del ambiente inflamatorio. Las células innatas producen IFN $\gamma$  en respuesta a la activación con IL-12 e IL-18, dos citoquinas inflamatorias que son producidas por las células mieloides cuando son activadas en contextos infecciosos/inflamatorios, ejerciendo un control de la infección en sus etapas tempranas. Esto podría ser importante en los humanos ya que estas células podrían participar en la defensa del hospedador durante el período neonatal o niñez temprana antes del establecimiento de la respuesta de memoria convencional<sup>[34]</sup>.

Las células T CD8<sup>+</sup> innatas expresan diferencialmente el factor de transcripción Eomes. Existe una interacción entre la expresión de Tbet y Eomes en los distintos tipos de células de memoria. Tbet está asociado frecuentemente a una buena respuesta efectora mientras que Eomes se asocia con una respuesta de memoria de larga vida, por lo cual sería interesante evaluar el rol de las células T CD8<sup>+</sup> innatas en la generación de inmunidad protectora<sup>[34]</sup>.

Se han realizado diversos estudios sobre el rol de las células T CD8<sup>+</sup> innatas en diferentes modelos de infección<sup>[49, 50]</sup> e incluso en cáncer<sup>[51]</sup>. Recientes estudios han demostrado que infecciones parasitarias, virales o bacterianas pueden activar células T CD8<sup>+</sup> de memoria innata que proliferan y se convierten en potentes células efectoras en ausencia de estimulación específica de antígeno, a través de un proceso de inflamación natural conocido como “activación alternativa”. En un modelo de inmunización con *Listeria monocytogenes* (Lm), Soudja y col. demostraron que, células T CD8<sup>+</sup> de memoria innata adquieren funciones efectoras y expresan marcadores de activación sin requerir del reconocimiento antigénico. Además este fenómeno, que contribuye a la inmunidad antibacteriana, depende de la IL-15 e IL-18 que son citoquinas producidas por los monocitos inflamatorios al ser expuestos a diferentes clases de patógenos<sup>[52]</sup>.

Uno de los mecanismos por los cuales se cree que actúan las células T CD8<sup>+</sup> innatas es a través de la expresión de NKG2D (miembro D del grupo 2 de receptores de NK), que es un receptor de tipo lectina que se expresa en varios tipos celulares incluyendo a las células NK, células T $\gamma\delta$ , y algunas células T CD8<sup>+</sup> $\alpha\beta$  activadas como las células innatas. Este receptor regula la respuesta inmune contra infecciones y cáncer ya que las células infectadas, o cancerígenas expresan algunos de los ligandos de NKG2D, por lo que cuando éste se une a su contraparte en las células blanco es capaz de ejercer una actividad citolítica. En el estudio de Chu y col., se demostró que células T CD8<sup>+</sup> de memoria activadas alternativamente, podían controlar la carga patogénica inicial destruyendo a las células infectadas a través de un mecanismo dependiente de NKG2D, antes de que se inicie la respuesta inmune adaptativa<sup>[53]</sup>. En un modelo de ratón de infección con influenza, se demostró que la transferencia adoptiva de células T CD8<sup>+</sup> de memoria específicas de OVA, proliferan en pulmón e incrementan la expresión de NKG2D en respuesta al patógeno<sup>[54]</sup>. Por otro lado, en diferentes estudios en modelos murinos de cáncer en los cuales se realizan inmunoterapias con citoquinas como el tratamiento con Doxorubicina más IL-12<sup>[55]</sup>, IL-2 más un anticuerpo anti-CD40 (molécula co-estimuladora)<sup>[54]</sup> o con ALT-803 que es un super-agonista del receptor de IL-15 que tiene una actividad 4-5 veces mayor que la IL-

15<sup>[56]</sup>, se demostró que se estimulan células T CD8<sup>+</sup> NKG2D<sup>+</sup>, éstas proliferan y producen grandes cantidades de IFN $\gamma$  y tienen la capacidad de matar a las células tumorales al ser reclutadas al microambiente tumoral.

Las células innatas también se han estudiado en un ambiente normal en ausencia de inflamación y se ha descrito que pueden ayudar a las células T convencionales a secretar citoquinas y proliferar, a través de la interacción de CD44 con su ligando<sup>[37]</sup>.

**HIPÓTESIS**

**Y**

**OBJETIVOS**

El timo es un órgano linfático primario en el cual se desarrollan las células T que luego van a ser exportadas hacia los OLS para conformar la segunda línea de defensa, la inmunidad adaptativa. En nuestro grupo, estamos estudiando hace varios años los cambios que ocurren en la ontogenia de las células T durante procesos infecciosos/inflamatorios tipo Th1. En estas condiciones el timo sufre modificaciones como atrofia tímica y cambios en la función y moléculas que expresan las CETs, fenómenos que podrían afectar los procesos de selección tímica y el desarrollo de los linfocitos T. A su vez esto también podría incidir directamente en el conjunto de células T que van a ser exportadas a periferia luego de completar su maduración en timo y la calidad de la respuesta inmune que se desarrolle en OLS.

En nuestro grupo de investigación hemos descrito que durante procesos infecciosos/inflamatorios de tipo Th1 se observa un incremento en la recirculación de células T maduras desde la periferia hacia el timo y un aumento en particular en las poblaciones de células T SP CD4 y CD8 activadas (CD44<sup>hi</sup>)<sup>[13]</sup>. Este fenómeno podría incidir también en los procesos de selección tímica y provocar cambios en las subpoblaciones de timocitos que están en desarrollo. Sin embargo, el elevado número de células T CD44<sup>hi</sup> que se encuentra en el timo en estas condiciones inflamatorias tipo Th1 resulta difícilmente explicado únicamente por la entrada de células T periféricas, y es más evidente en el subconjunto CD8, el cual está particularmente enriquecido en células CD44<sup>hi</sup><sup>[13]</sup>. Es por ello que hipotetizamos que algunos de dichos timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup>, que describimos en estos modelos murinos inflamatorios, podrían originarse en timo como una vía alternativa a la convencional. Esto se fundamenta en que en los últimos años se ha descrito un nuevo subtipo de células CD8<sup>+</sup> denominadas células innatas. Las mismas se desarrollan en timo en condiciones en las cuales se desvía la diferenciación de las células convencionales hacia las innatas por cambios en diferentes factores ambientales como las citoquinas y un incremento en la expresión de moléculas de CMH no clásicas. Estas células innatas presentan un fenotipo de memoria con incremento en la expresión de la molécula CD44 y exhiben una respuesta rápida efectora produciendo IFN $\gamma$ .

Teniendo en cuenta los datos planteados, formulamos la siguiente **hipótesis de trabajo**: “Bajo situaciones sistémicas inflamatorias/infecciosas que cursan en forma aguda con un fuerte componente Th1, el timo experimenta alteraciones anatómicas (marcada reducción de la zona cortical) y cambios tanto en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad como de citoquinas capaces de modificar el microambiente



tímico favoreciendo el desvío de las células T CD8<sup>+</sup>, desde el linaje convencional hacia el innato”.

En este contexto se planteó el siguiente objetivo general:

**“Evaluar alteraciones sobre la ontogenia convencional de las células T que se desarrollan en el tejido tímico por efecto de procesos sistémicos inflamatorios/infecciosos agudos”.**

Para cumplir el objetivo general propusimos los siguientes objetivos específicos:

- ☞ Caracterizar fenotípicamente a los timocitos SP CD8 del linaje innato presentes en timo durante procesos infecciosos/inflamatorios sistémicos de tipo Th1.
- ☞ Evaluar la capacidad protectora de las células SP CD8 innatas generadas en timo durante procesos infecciosos/ inflamatorios sistémicos de tipo Th1.
- ☞ Identificar los mecanismos responsables de los cambios en la decisión de linaje sobre la población CD8 SP (convencional vs innata) que ocurre en timo durante condiciones infecciosas/inflamatorias Th1.

Para cumplir los objetivos en esta tesis utilizamos tres modelos experimentales para evaluar los cambios en la ontogenia de células T CD8<sup>+</sup> en timo, en circunstancias en donde existe una gran producción sistémica de IL-12 más IL-18. Estos modelos son: infección con el parásito *T. cruzi*, infección con el hongo *Candida albicans* e inyección hidrodinámica de plásmidos de expresión de IL-12 e IL-18. Los primeros dos modelos implican el desarrollo de un proceso inflamatorio agudo tipo Th1 gatillado por un patógeno, mientras que en el último modelo experimental nos interesa evaluar si los cambios observados en la ontogenia tímica pueden ser mediados en forma directa por las citoquinas IL-12 mas IL-18 de manera Ag independiente.

# **RESULTADOS**

## CAPÍTULO I: RECIRCULACIÓN DE LINFOCITOS ACTIVADOS DESDE ORGANOS LINFATICOS SECUNDARIOS (OLS) HACIA TIMO DURANTE CONDICIONES INFECCIOSAS INFLAMATORIAS TIPO TH1

### Caracterización de linfocitos con fenotipo activado/memoria que se encuentran en timo durante condiciones infecciosas inflamatorias tipo Th1

El timo es un órgano linfático primario en el cual se desarrollan los linfocitos T. Los precursores linfoides ingresan al timo desde la médula ósea y van sufriendo distintos procesos de maduración mediado por las CECT como así también las CEMT, CD y Ma. Estos procesos también son dependientes de citoquinas como IL-7 y factores de crecimiento. El desarrollo de las células T finaliza luego de los procesos de selección positiva y negativa que experimenta el timocito y la expresión de un marcador fenotípico como es la molécula co-receptora CD4 o CD8, generándose así un timocito maduro SP que va a ser exportado a los OLS. Ha sido reportado que en condiciones normales se exportan desde el timo células SP CD4 o CD8 hacia los OLS pero no se observa recirculación de células maduras activadas desde los OLS hacia el timo. Se lo consideraba por lo tanto, como un órgano inmunoprivilegiado al igual que al sistema nervioso central, es decir que el tráfico de linfocitos desde el timo iba en una sola dirección.

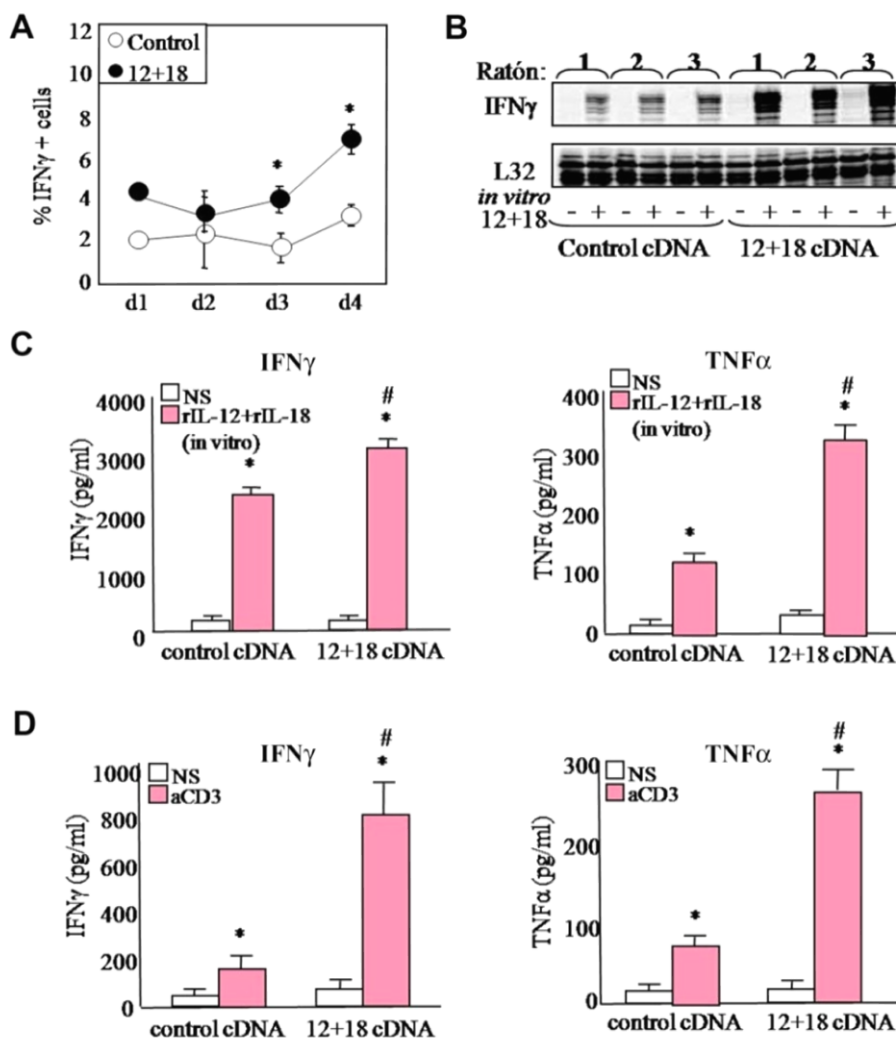
Sin embargo, actualmente se conoce que cuando ocurren diferentes procesos en la periferia como inflamación e infecciones, entre otros, el timo sufre cambios a nivel estructural que afectan el normal desarrollo de las células T. Esto ocurre como consecuencia de efectos sistémicos como son la producción de glucocorticoides y citoquinas inflamatorias.

En nuestro grupo de investigación describimos previamente que, como consecuencia de procesos infecciosos o inflamatorios de tipo Th1, donde existe una gran producción sistémica de dos citoquinas pro-inflamatorias, IL-12 e IL-18, como es el caso del tratamiento con LPS, la infección con *T. cruzi* o *C. albicans*, o la expresión sistémica de IL-12 + IL-18 por inyección hidrodinámica de sus respectivos plásmidos, cierto tipo de células T CD4 y CD8 que residen en los OLS son capaces de entrar en el timo<sup>[13]</sup>. Estas células a su vez presentan un fenotipo maduro activado caracterizado por la alta expresión del marcador de activación linfocitario CD44<sup>[13]</sup>. Observamos también un incremento en el número absoluto de las células CD44<sup>hi</sup> tanto en el modelo de infección con *T. cruzi*, a distintos tiempos post infección, como así también en el modelo de expresión sistémica de IL-12 + IL-18<sup>[13]</sup>. Este proceso de migración de células maduras a timo ocurre como un efecto alternativo

“bystander” Ag-independiente del patógeno en sí gatillado principalmente por la expresión sistémica de citoquinas inflamatorias<sup>[13]</sup>.

Teniendo en cuenta que este fenómeno ocurre durante respuestas inmunes sistémicas de tipo Th1, especulamos que las células T que reingresan al timo en estas circunstancias podrían tener la capacidad de producir citoquinas tipo Th1 como IFN $\gamma$ . Entonces, evaluamos la producción de dicha citoquina a distintos días post inyección hidrodinámica de IL-12 e IL-18. Observamos que entre el día 3 y 4 post inyección un 6-8% de los timocitos totales fueron capaces de producir IFN $\gamma$  *ex-vivo* (Figura 11A). Así también se aislaron los timocitos de animales inyectados con IL-12 e IL-18 y se cultivaron por 72hs *in vitro* con las mismas citoquinas. Los timocitos aislados de animales inyectados con IL-12 + IL-18 presentaron una mayor expresión de RNA de IFN $\gamma$  que los timocitos aislados de animales control que sólo habían sido inyectados con el plásmido vacío (ORF) (Figura 11B). La evaluación de la secreción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  en los sobrenadante de cultivo, por ensayos de ELISA, mostró que los timocitos expuestos *in-vivo* a IL-12 e IL-18 fueron capaces de secretar mayor cantidad de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  que los timocitos control tanto al ser re-estimulados *in vitro* con IL-12 e IL-18 (Figura 11C) como con un anticuerpo anti-CD3 adherido a la placa de cultivo para activarlos a través de la vía del TCR (Figura 11D).

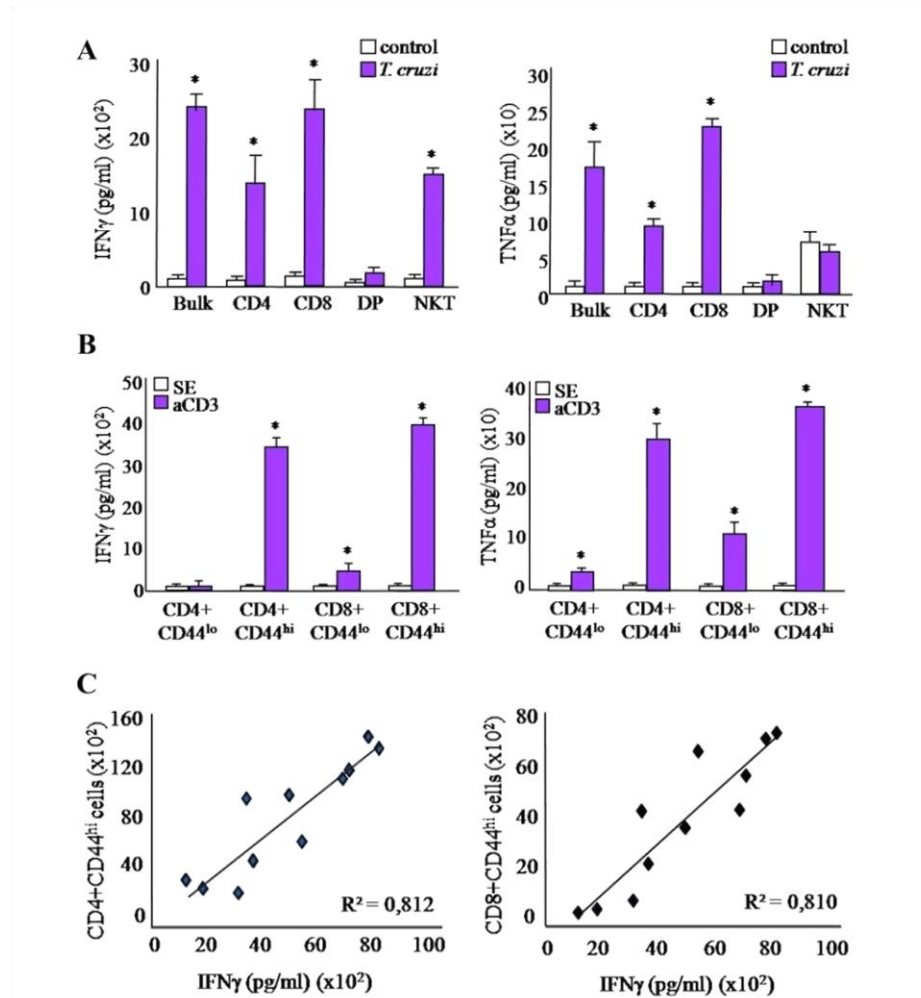
Como estos resultados fueron obtenidos en un modelo de expresión sistémica de IL-12 e IL-18 (inyección hidrodinámica), en ausencia de cualquier microorganismo, se quiso trasladar estos resultados a un modelo inflamatorio tipo Th1 patofisiológico, para ello utilizamos la infección con *T. cruzi*. Este microorganismo es un parásito intracelular causal de la enfermedad de Chagas y está descrito que en la etapa aguda de la infección provoca una respuesta inflamatoria de tipo Th1 en el huésped con una gran producción sistémica de IL-12+IL-18<sup>[26]</sup>. En nuestro modelo, los timocitos de los animales infectados con *T. cruzi* fueron cultivados *in vitro* en presencia de anti-CD3 para evaluar la producción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . Como se muestra en la Figura 12A los timocitos de animales infectados producen mayor cantidad de dichas citoquinas que los aislados de animales control sin infectar. Utilizando el sorteador de células se aislaron los distintos subtipos celulares y observamos que los timocitos SP CD4, SP CD8 así como las células NKT de animales infectados con *T. cruzi* eran mejores productores de citoquinas de tipo Th1 que los mismos subtipos celulares aislados de animales control (Figura 12A). Esto demuestra que durante la fase aguda de procesos infecciosos sistémicos, el timo sufre cambios tanto en la estructura como composición celular, con una prevalencia de timocitos capaces de producir una gran cantidad de citoquinas de tipo Th1.



**Figura 11:** Producción de las citoquinas inflamatorias IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . (A) Porcentaje de timocitos IFN $\gamma$ <sup>+</sup> aislados de timo de animales inyectados hidrodinámicamente con los plásmidos de expresión para IL-12 +IL-18 (grupo 12+18) o control a distintos días post inyección. (B) Expresión del RNA de IFN $\gamma$  en timocitos aislados del grupo control o 12+18 re-estimulados *in vitro* con las citoquinas recombinantes IL-12 e IL-18. La producción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  fue evaluada por ELISA en sobrenadantes de cultivo de timocitos del grupo control o 12+18 estimulados *in vitro* con (C) IL-12 + IL-18 o (D) con anti-CD3 adherido a la placa de cultivo. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares. Valores de \*  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. NS = no estimulado.

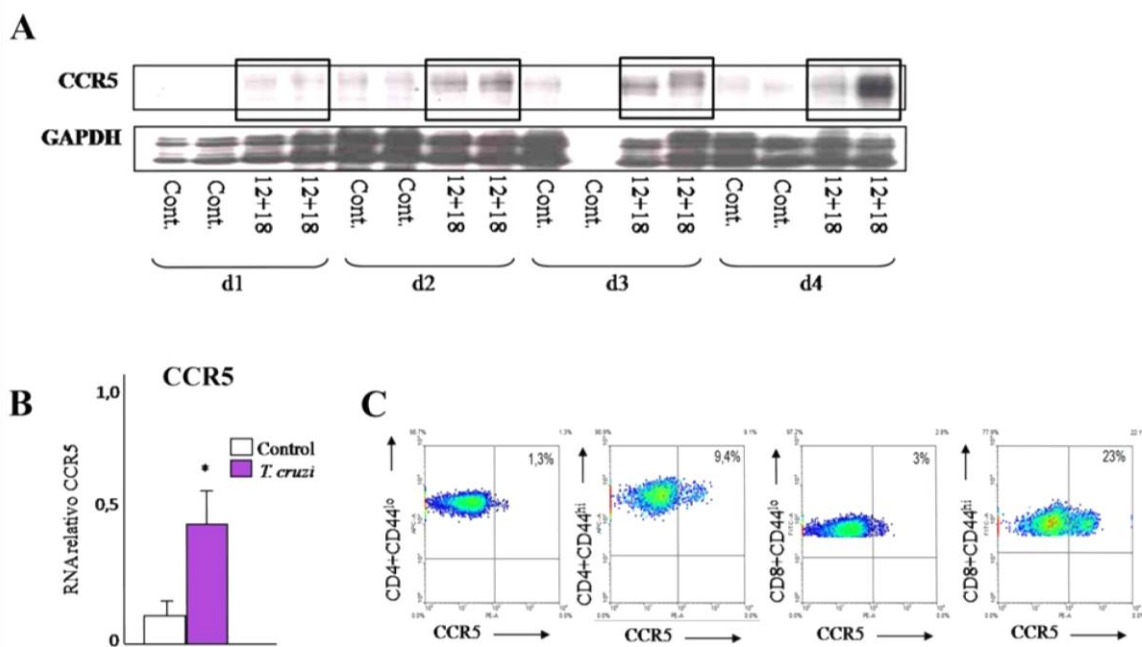
Previamente describimos que en los timos de animales tratados con IL-12+IL-18 o infectados con *T. cruzi* muestran un incremento en el número de timocitos SP CD44<sup>hi</sup> comparado con animales control<sup>[13]</sup>. Teniendo en cuenta estos resultados, se separaron las poblaciones SP CD4 y CD8 en función de la expresión de CD44 de timo de animales infectados con *T. cruzi* y se determinó la población responsable de la gran producción de

IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . Comprobamos que los timocitos SP CD44<sup>hi</sup> al ser estimulados *in vitro* con anti-CD3 eran mejores productores de estas citoquinas Th1 que los timocitos SP CD44<sup>lo</sup> (Figura 12B). A su vez determinamos que el número de células CD44<sup>hi</sup> que contiene un timo en particular, se co-relaciona positivamente con los niveles de IFN $\gamma$  producidos *in vitro* luego de la estimulación (Figura 12C).



**Figura 12:** Determinación de las poblaciones productoras de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  en timo de animales infectados con *T. cruzi*. (A) Se evaluó la producción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  por Elisa en el sobrenadante de cultivo de timocitos totales o de las distintas subpoblaciones separadas por “cell sorting” de animales control o infectados con *T. cruzi* luego de 24 hs de cultivo en presencia de anti-CD3 adherido a la placa de cultivo. (B) Las subpoblaciones de timocitos SP CD4 o CD8 CD44<sup>hi</sup> o CD44<sup>lo</sup> fueron purificadas por “cell sorting”, se cultivaron *in vitro* por 24 hs en presencia de un anti-CD3 y se determinó la producción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  en el sobrenadante de cultivo por ELISA. (C) Correlación entre el número absoluto de células CD4 o CD8 CD44<sup>hi</sup> y la producción de IFN $\gamma$  en timo en animales infectados con *T. cruzi*. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares. Valores de \* p<0,05 fueron considerados estadísticamente significativos. SE: condición sin estímulo.

En un trabajo anterior del grupo de investigación se reportó que los timocitos estimulados *in vitro* con IL-12 + IL-18 no sólo producen citoquinas como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  sino que también expresan el receptor de quimiocinas CCR5 asociado a un perfil Th1<sup>[28]</sup>. A los fines de evaluar la expresión de este receptor realizamos los ensayos de RT-PCR en timocitos aislados de animales tratados *in vivo* con IL-12+IL-18. Determinamos que CCR5 incrementa su expresión a distintos días post-inyección en timocitos de animales del grupo 12+18 respecto a timocitos de animales del grupo control (Figura 13A). Cuando evaluamos la expresión de CCR5 en el modelo de infección con *T. cruzi* obtuvimos similares resultados (Figura 13B) y además por citometría de flujo intracelular pudimos determinar que CCR5 se expresa preferencialmente en los timocitos SP CD4<sup>hi</sup> (Figura 13C).



**Figura 13:** Expresión del receptor de quimiocinas CCR5 en timocitos. (A) Se extrajo el RNA de timocitos aislados de animales inyectados con el plásmido control o de expresión de IL-12 + IL-18 hasta el día 4 post-inyección y se evaluó por RT-PCR la expresión de transcritos de ARN CCR5. Se aislaron los timocitos de animales control o al día 14 post-infección con *T. cruzi* y se evaluó la expresión de transcritos de ARN de CCR5 por PCR cuantitativa. (C) Se aislaron los timocitos de animales infectados con *T. cruzi* al día 14 pi y se analizó la expresión de CCR5 por citometría de flujo en las diferentes subpoblaciones de timocitos SP CD4 y SP CD8. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares. Valores de \*  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

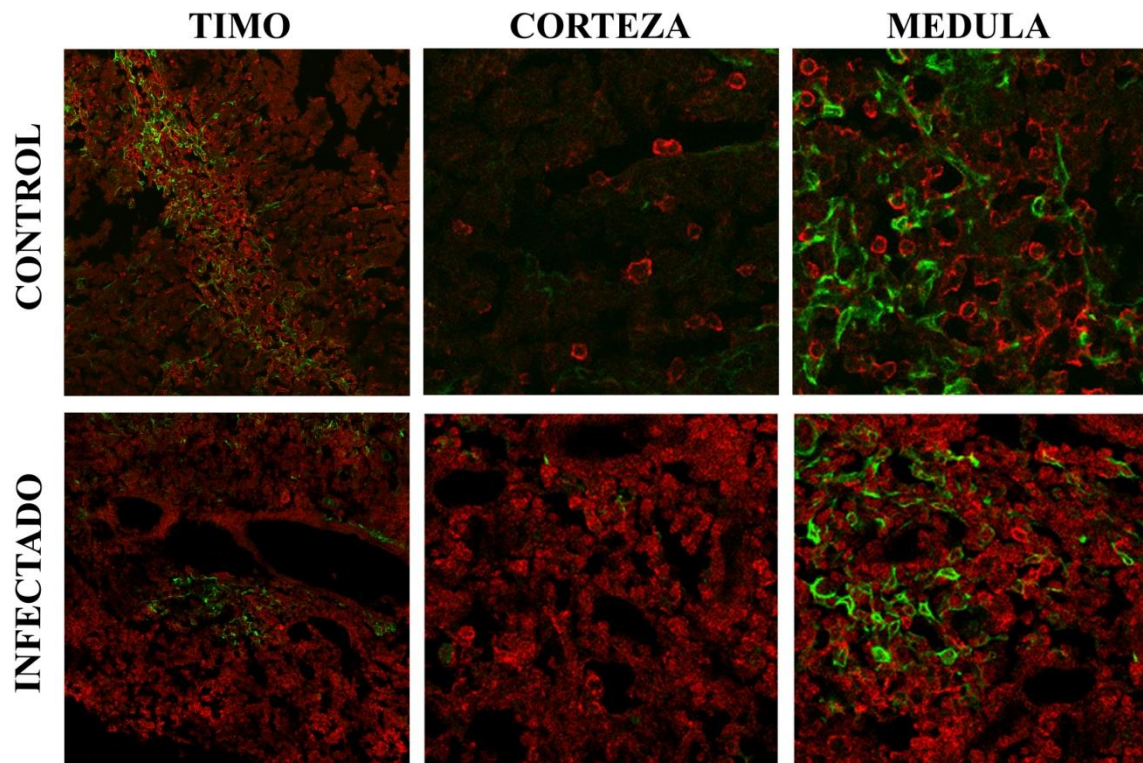
En base a lo expuesto anteriormente, durante un proceso infeccioso Th1 o luego de la producción sistémica de IL-12 + IL-18, en el timo se encuentran células T con un fenotipo

activado/memoria (CD44<sup>hi</sup>) capaces de producir altos niveles de citoquinas Th1 cuando son re-estimulados *in vitro* ya sea con IL-12 + IL-18 o mediante la estimulación de CD3.

#### Localización y especificidad de las células CD44<sup>hi</sup> presentes en timo durante procesos infecciosos/inflamatorios de tipo Th1

La anatomía del timo es muy importante durante el desarrollo de los linfocitos T ya que las células en diferentes estadios de maduración pueden encontrarse en distintas regiones del órgano como la zona cortical o medular tímica. Es por esto que nos propusimos evaluar la localización de las células CD44<sup>hi</sup> presentes en timo bajo condiciones infecciosas/inflamatorias. Realizamos ensayos de inmunofluorescencia, en cortes de tejido tímico (10 µm de espesor) de animales control o infectados con *T. cruzi*, utilizando un anticuerpo específico para la citoqueratina 5 (CK5) expresada por las CEMT, que permite diferenciar la zona medular de la cortical. Junto con el anti-CK5 utilizamos otro anticuerpo que reconoce la molécula CD44. En estos cortes pudimos observar que, tanto en animales controles como infectados, las áreas cortical o medular podían distinguirse fácilmente en base a la expresión de CK5. Además la tinción nos permitió demostrar que las células CD44<sup>hi</sup> están altamente enriquecidas en el timo de animales infectados con *T. cruzi* respecto de los animales controles corroborando los resultados previos obtenidos por citometría de flujo<sup>[13]</sup>. En el caso de animales del grupo control, puede visualizarse que la mayoría de las células CD44<sup>hi</sup> se encuentran en la zona medular, en cambio en los animales del grupo *T. cruzi* están distribuidos en forma homogénea tanto en la zona cortical como medular del órgano (Figura 14).

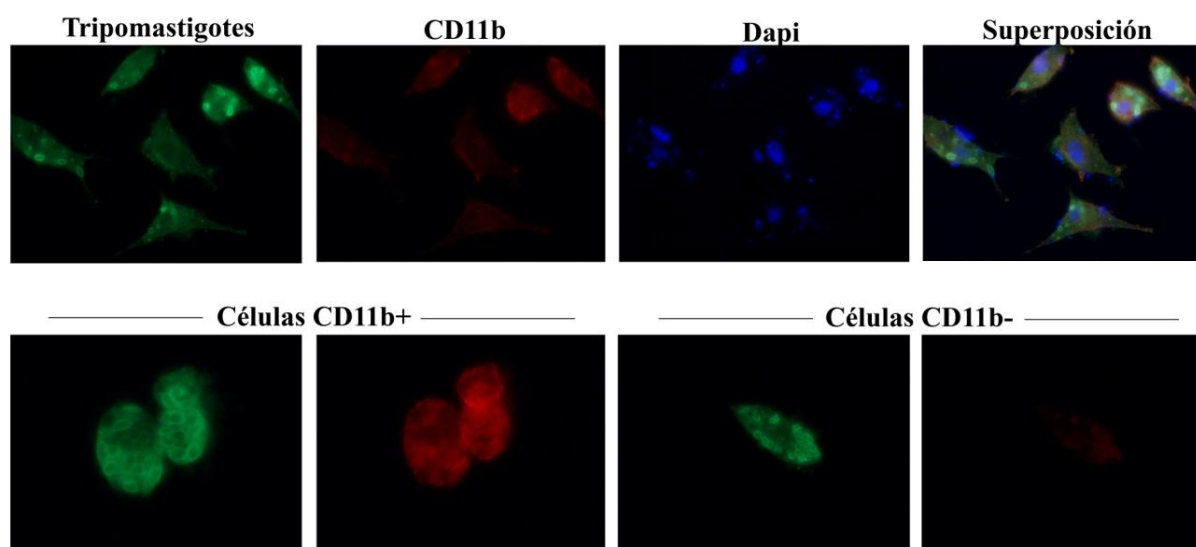




**Figura 14:** Evaluación de la localización de las células  $CD44^{hi}$  en las distintas zonas del timo. Se extrajeron los timos de animales infectados con *T. cruzi* al día 14 dpi o de animales control sin infectar y se fijaron en paraformaldehído al 4%. Las figuras muestran la tinción inmunofluorescente de CK5 (Alexa flúor 488), CD44 (Alexa flúor 546), en secciones tímicas de 10  $\mu\text{m}$  de espesor. En las mismas se observa de color verde a las células epiteliales de la médula tímica (CEMT) delimitando las zonas del timo y en rojo a las células que expresan CD44.

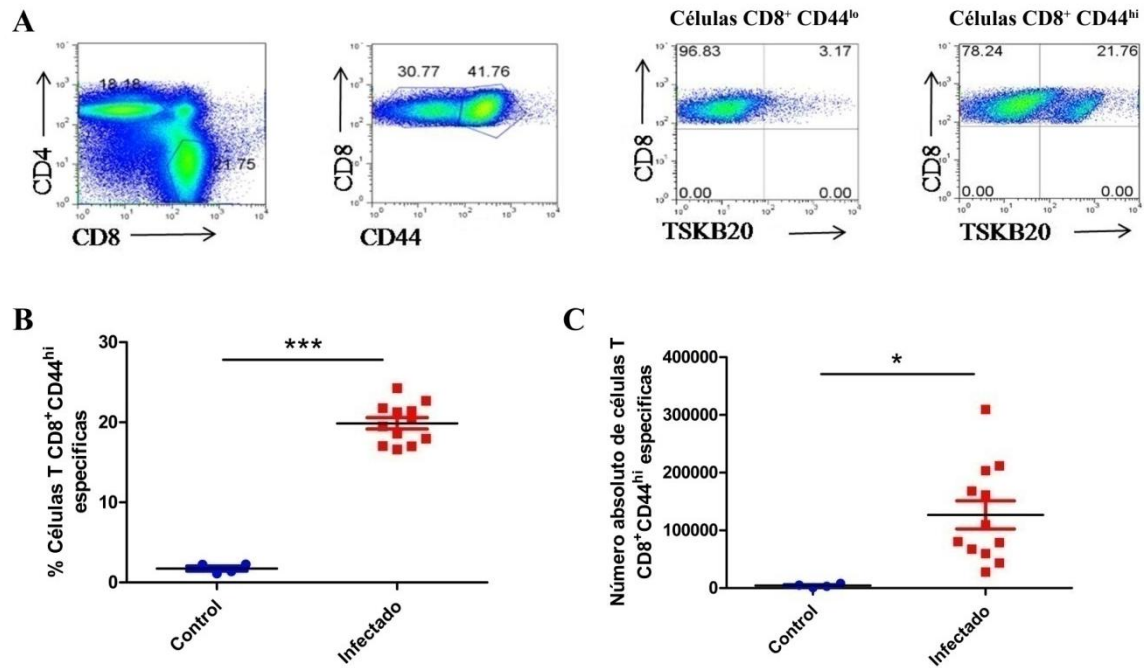
Aunque hemos demostrado que este efecto migratorio no depende de la presencia un Ag en particular<sup>[13]</sup>, la gran cantidad de células T  $CD44^{hi}$  encontradas en el timo de ratones infectados con *T. cruzi* nos permite especular que también podría haber recirculación de células T específicas al órgano, ya que ha sido reportado por otros grupos de investigación que *T. cruzi* es un patógeno capaz de infectar células epiteliales tímicas<sup>[14, 20]</sup>. A los fines de evaluar la presencia de Ags de *T. cruzi* en timo realizamos ensayos de inmunofluorescencia utilizando el suero de pacientes chagásicos ya que el parásito en su estadio tripomastigote es intracelular y puede ser observado dentro de las células infectadas<sup>[57]</sup>. En la figura 15 se puede observar la presencia de tripomastigotes dentro de células adherentes del timo aisladas de animales infectados. La marcación con un anticuerpo que reconoce la molécula CD11b demostró que *T. cruzi* es capaz de infectar Ma (células  $CD11b^+$ ) como así también células  $CD11b^-$  con morfología alargada y ovalada que podría ser compatible con la de

fibroblastos tímicos. La presencia del parásito dentro del timo nos sugiere que células T específicas de Ags podrían estar llegando al órgano desde la periferia. Por lo tanto, evaluamos la presencia de células T CD8<sup>+</sup> específicas para *T. cruzi* dentro del timo. Mediante citometría de flujo empleando tetrámeros de moléculas CMH-I cargadas con un péptido específico de *T. cruzi*, TSKB20, marcadas con un fluorocromo, pudimos observar que en la subpoblación de timocitos SP CD8 estaban presentes células T específicas para el Ag de *T. cruzi* sólo en los animales infectados, representando alrededor del 20% del total de los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> (Figura 16A-C).



**Figura 15:** Presencia de *T. cruzi* en timo. Se infectaron ratones B6 con  $5 \times 10^5$  parásitos de *T. cruzi* y se obtuvieron las suspensiones celulares de los timos 14 días después de la infección. Las células adherentes se cultivaron durante 24 horas en portaobjetos dentro de placas de cultivo con medio suplementado. A continuación, las células se tiñeron con un antisero de un paciente chagásico y posteriormente con una IgG anti-humano conjugada con Alexa Fluor 488. Se muestra en verde los parásitos de *T. cruzi*, en rojo células positivas para CD11b (Alexa Fluor 546) y en azul los núcleos marcados con DAPI.

Conociendo que TSKB20 es uno de los Ags más inmunogénicos de *T. cruzi*, resultó sorprendente que sólo un 20% dentro de la población de células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> fueran células específicas para dicho Ag, lo que también indica que resulta improbable que el 80% de células restantes sean específicas para otros Ags del parásito. Este hallazgo nos hizo especular que otra población de células con fenotipo activado/memoria podrían encontrarse en timo en estas condiciones.



**Figura 16:** Presencia en timo de células T CD8<sup>+</sup> específicas de *T. cruzi*. Se obtuvieron los timocitos de ratones B6 infectados con *T. cruzi* (14 días después de la infección). Se realizó citometría de flujo utilizando un tetramero de moléculas de MHC-I unidas covalentemente al péptido TSKB20 de *T. cruzi* y marcado con un fluorocromo junto con anticuerpos que reconocen CD4, CD8 y CD44. (A) Se muestra la estrategia de selección de poblaciones utilizada. (B) Se calculó el porcentaje y (C) el número absoluto de células CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> TSKB20<sup>+</sup>. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM, el gráfico es representativo de dos experimentos independientes con resultados similares utilizando un n=5-12 animales por grupo. Valores de \* p<0,05 y \*\*\* p<0,001 fueron obtenidos mediante el test estadístico ANOVA de una vía.

## CONCLUSIONES CAPITULO I

En este primer capítulo de resultados empleamos diferentes modelos animales de procesos infecciosos/inflamatorios con un fuerte componente de tipo Th1 como la infección con *T. cruzi* o *C. albicans* o la inyección hidrodinámica de IL-12 + IL-18. Bajo estas circunstancias hemos podido determinar:

- ✓ Durante la fase aguda de procesos infecciosos sistémicos, el timo sufre cambios tanto en la estructura como composición celular, con un incremento en el número de timocitos con un perfil activado caracterizado por una alta expresión de CD44.
- ✓ Estos timocitos SP CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> son capaces de producir una gran cantidad de citoquinas de tipo Th1 como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , cuando son re-estimulados *in vitro* ya sea con IL-12 + IL-18 o con anti-CD3.
- ✓ Durante la etapa aguda de la infección con *T. cruzi* el timo se convierte en un órgano blanco que es infectado por el parásito. Este patógeno en su estadio de tripomastigote se aloja tanto en células CD11b<sup>+</sup> (Ma) como CD11b<sup>-</sup> (posibles CET).
- ✓ Además, en la infección con *T. cruzi* aproximadamente un 20% de las células T SP CD8 CD44<sup>hi</sup> presentan un TCR específico para uno de los Ags inmunodominantes del parásito, TSKB20. Teniendo en cuenta que TSKB20 es uno de los Ags inmunodominantes es poco probable que el 80% restante de las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> sean específicas de *T. cruzi*. Por lo tanto este hallazgo nos hizo especular que otra población de células con fenotipo activado/memoria podrían encontrarse en timo en estas condiciones.

En conjunto, estos datos sugieren que durante condiciones infecciosas/inflamatorias de tipo Th1 el timo sufre cambios a nivel estructural, incrementa la recirculación de células desde los OLS así como también cambia el fenotipo de timocitos que se están diferenciando en su interior, evidenciando un incremento en timocitos con un perfil activado/memoria (CD44<sup>hi</sup>) capaces de producir una gran cantidad de citoquinas inflamatorias como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ .

## CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS CD8 INNATAS EN TIMO DURANTE CONDICIONES INFECCIOSAS INFLAMATORIAS TIPO TH1

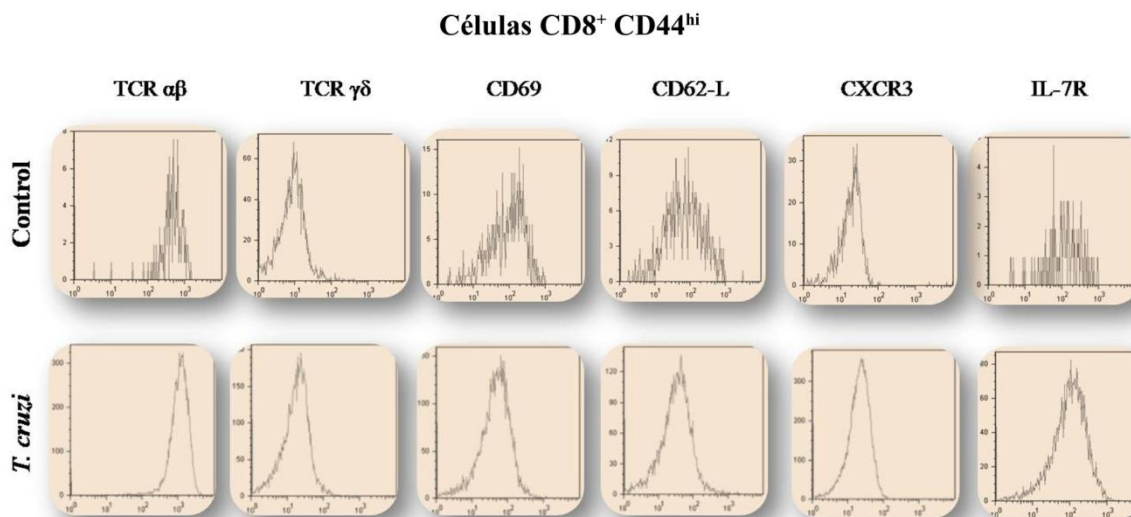
En los últimos años se ha descrito un nuevo subtipo de linfocito T CD8<sup>+</sup> que presentan algunas características de las células de la inmunidad innata como lo son la capacidad de producir gran cantidad de citoquinas como IFN $\gamma$  de una manera rápida e independiente de Ag. Estas células fueron descritas inicialmente en diversos animales KO (knock out) para distintas proteínas involucradas en la señalización del TCR (Tec kinasa Itk y Rlk o el factor de transcripción de tipo Kruppel 2 (KLF2)<sup>[33, 39, 40, 42, 58]</sup>. La ausencia de dichas proteínas favorece el desarrollo del linaje T CD8<sup>+</sup> innato respecto del convencional y los timocitos doble positivos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> presentan un incremento de uno de los factores de transcripción de la familia T-box denominado Eomesodermina (EOMES) que conlleva a la generación de células CD8<sup>+</sup> con características similares a una célula de memoria, con una capacidad efectora rápida de producción de citoquinas y una dependencia de la citoquina IL-15<sup>[40]</sup>. Estas células CD8<sup>+</sup> innatas presentan un TCR formado por las cadenas  $\alpha\beta$  con especificidad para moléculas no clásicas de CMH-I de tipo Ib y se generan en timo a partir de la diferenciación que sufre el precursor tímico DP al interactuar con células derivadas de médula ósea, y no con células epiteliales tímicas como ocurre para la generación de los timocitos SP convencionales. Además estas células presentan un fenotipo activado caracterizado por una gran expresión de las moléculas CD44 y CD122 y poseen funciones efectoras<sup>[35-37, 40, 43, 45]</sup>.

En base a los resultados descritos hasta el momento nos preguntamos si además de una recirculación de células maduras desde periferia hacia el timo había una desviación en el desarrollo de los timocitos que pudiera estar favoreciendo al linaje de linfocitos CD8<sup>+</sup> innatos. Para abordar ésta hipótesis caracterizamos las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> en los modelos de infección con *T. cruzi* y el hongo *Cándida albicans*, ambos inductores de una respuesta de tipo Th1, y en el modelo de inyección hidrodinámica de IL-12+IL-18.

### Fenotipo de las células T SP CD8 CD44<sup>hi</sup> encontradas en timo después de la infección con *T. cruzi*

Se aislaron timocitos de animales infectados con *T. cruzi* y control y se evaluó por citometría de flujo la expresión de moléculas características de células del linaje innato como: tipo de cadenas que forman el TCR, las moléculas de activación CD69 y CD62L, el receptor de IL-7 (IL-7R) que es importante para la supervivencia de los timocitos y el receptor

de la quemoquina CXCR3. Se observó que los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> de animales infectados expresan un TCR compuesto por las cadenas  $\alpha\beta$  y no  $\gamma\delta$ , tienen una expresión intermedia de CD69, CD62L e IL-7R y no expresan CXCR3 (Figura 17). En base a estos resultados podemos decir que comparten características fenotípicas acorde al linaje CD8<sup>+</sup> innato.

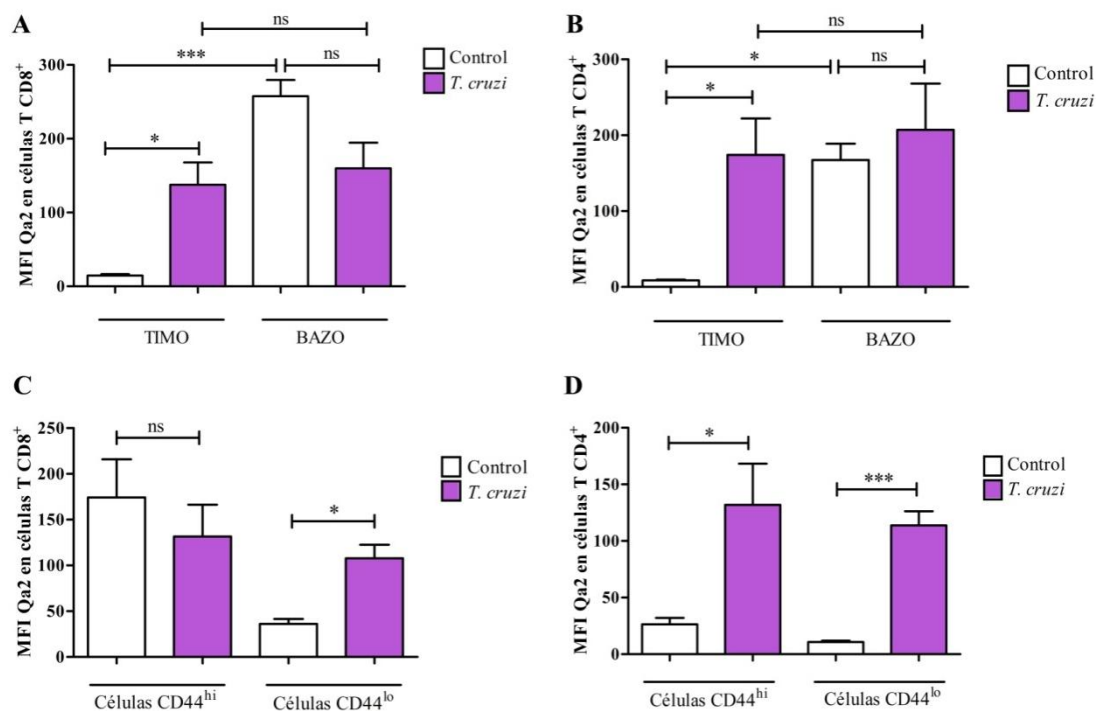


**Figura 17:** Caracterización de las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> en timo. Se aislaron los timocitos de ratones B6 control o infectados con *T. cruzi* (14 días después de la infección). Por citometría de flujo se seleccionaron las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> y se analizó la expresión de TCR $\alpha\beta$ , TCR $\gamma\delta$ , CD69, CD62-L, CXCR3, IL-7R.

#### Estudio del microambiente tímico: expresión de moléculas CMH-I no clásicas

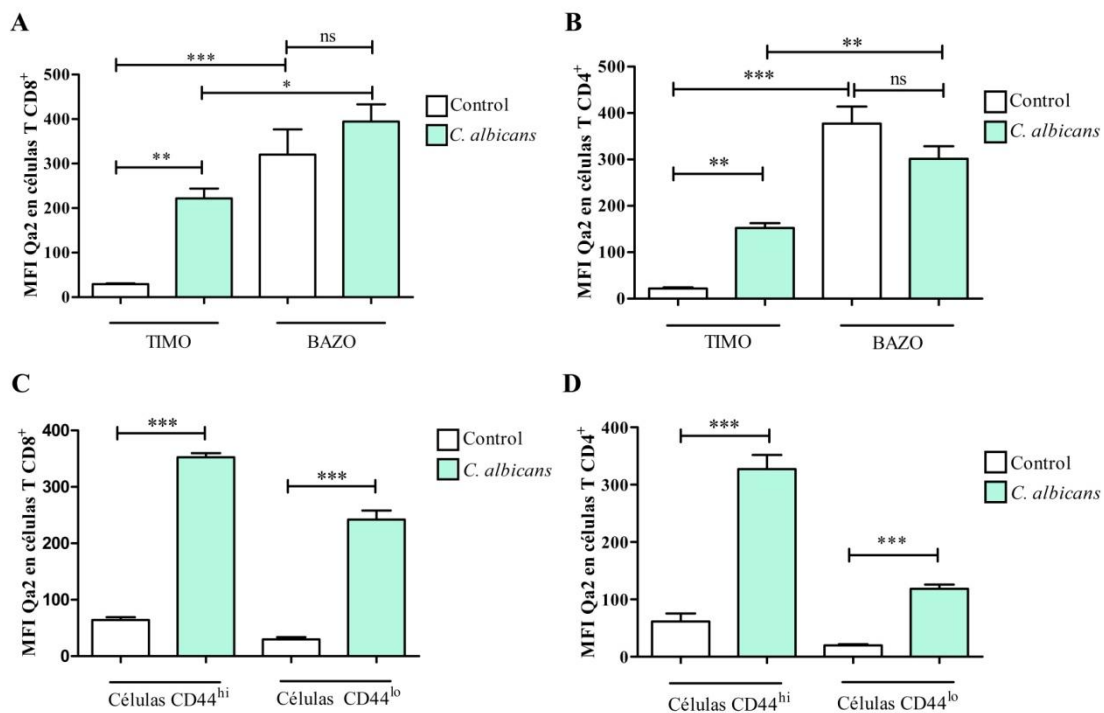
Por otro lado como se mencionó en la introducción, las células de linaje innato se pueden generar por interacción con otro timocito a través de las moléculas de CMH-I no convencionales, aunque todavía es controvertido si estas moléculas son o no importantes para su desarrollo<sup>[35, 36, 40, 42-45]</sup>. En este sentido decidimos evaluar la expresión de una molécula de CMH-Ib no clásica llamada Qa2. Para ello, aislamos los timocitos de animales control e infectados con *T. cruzi* y por citometría de flujo observamos un incremento significativo de Qa2, respecto a un timo normal, con niveles similares a los obtenidos en OLS como el bazo (Figura 18A y 18B). A su vez, esta molécula no es expresada por el estroma tímico sino por los mismos timocitos SP CD4 y CD8 tanto residentes (CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup> CD44<sup>lo</sup>) como con fenotipo maduro (CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup>), es decir, células hematopoyéticas como se describe en la tabla 1 (Figura 18C y 18D).





**Figura 18:** Expresión de la molécula CMH-Ib no clásica Qa2 en timocitos infectados con *T. cruzi*. Se aislaron los timocitos de ratones B6 control o infectados con *T. cruzi* (14 días después de la infección). Por citometría de flujo se analizó la expresión de Qa2 en timo y bazo total sobre la población de células T (A) CD8<sup>+</sup> o (B) CD4<sup>+</sup>, y de las diferentes sub-poblaciones celulares en timo: (C) SP CD8 CD44<sup>hi</sup> y SP CD8 CD44<sup>lo</sup> y (D) SP CD4 CD44<sup>hi</sup> y SP CD4 CD44<sup>lo</sup>. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  SEM. Los datos son el resultado de 3 repeticiones del mismo experimento con 3-5 animales por grupo. La prueba estadística aplicada fue un ANOVA de una vía. \* p<0,05, \*\* p<0,01 y \*\*\* p<0,001, ns = no significativo.

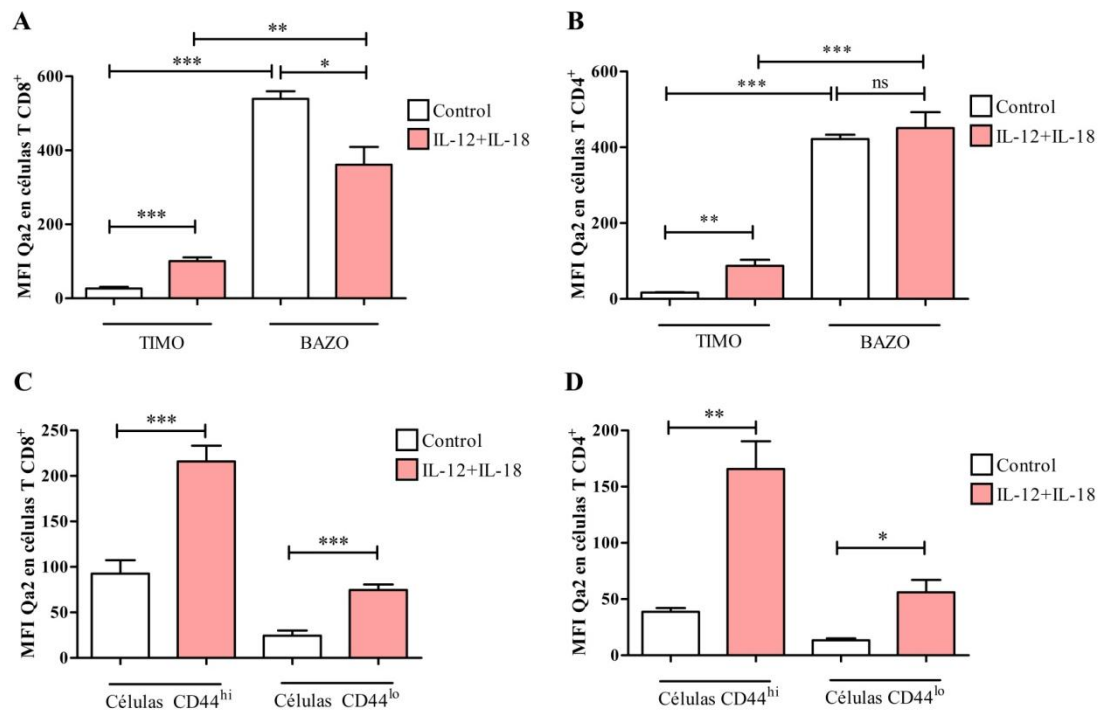
A continuación, realizamos el mismo ensayo pero en el modelo de infección con el hongo *C. albicans* (Figura 19) y en el modelo de inyección hidrodinámica con IL-12 + IL-18 (Figura 20) y encontramos resultados similares, es decir, un incremento en la expresión de Qa2 en timo total y en los timocitos SP CD4 y CD8 CD44<sup>lo</sup> y CD44<sup>hi</sup> en los animales infectados con *C. albicans* o tratados con IL-12 + IL-18, con respecto al grupo control. Por lo tanto, determinamos que en los tres modelos infecciosos/inflamatorios estudiados se observa un incremento significativo respecto a un timo control, de la molécula CMH-Ib no clásica llamada Qa2, con niveles similares a los obtenidos en OLS como el bazo.



**Figura 19:** Expresión de la molécula CMH-Ib no clásica Qa2 en timocitos infectados con *C. albicans*. Se aislaron las células de los timos de ratones B6 control o infectados con *C. albicans* (7 días después de la infección). Por citometría de flujo se analizó la expresión de Qa2 en timo y bazo total sobre la población de células T (A) CD8<sup>+</sup> o (B) CD4<sup>+</sup> y de las sub-poblaciones celulares en timo: (C) SP CD8 CD44<sup>hi</sup> y SP CD8 CD44<sup>lo</sup> y (D) SP CD4 CD44<sup>hi</sup> y SP CD4 CD44<sup>lo</sup>. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM. Los datos son el resultado de 3 repeticiones del mismo experimento con 3-5 animales por grupo. La prueba estadística aplicada fue un ANOVA de una vía. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ , ns = no significativo.

Hasta el momento no disponemos de datos que demuestren si este hecho es una coincidencia o si Qa2 está realmente participando en la diferenciación del linaje innato en nuestros modelos, sin embargo nos permite especular que al menos en nuestras condiciones experimentales, el microambiente tímico adquiere un fenotipo propicio para el desarrollo de células T CD8<sup>+</sup> innatas.





**Figura 20:** Expresión de la molécula CMH-Ib no clásica Qa2 en timocitos tratados en forma sistémica con IL-12 + IL-18. Se aislaron las células de los timos de ratones B6 control o tratados con IL-12 + IL-18 (7 días post-tratamiento). Por citometría de flujo se analizó la expresión de Qa2 en timo y bazo total sobre la población de células T (A) CD8<sup>+</sup> o (B) CD4<sup>+</sup> y de las diferentes sub-poblaciones celulares en timo: (C) SP CD8 CD44<sup>hi</sup> y SP CD8 CD44<sup>lo</sup> y (D) SP CD4 CD44<sup>hi</sup> y SP CD4 CD44<sup>lo</sup>. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM. Los datos son el resultado de 3 repeticiones del mismo experimento con 3-5 animales por grupo. La prueba estadística aplicada fue un ANOVA de una vía. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ , ns = no significativo.

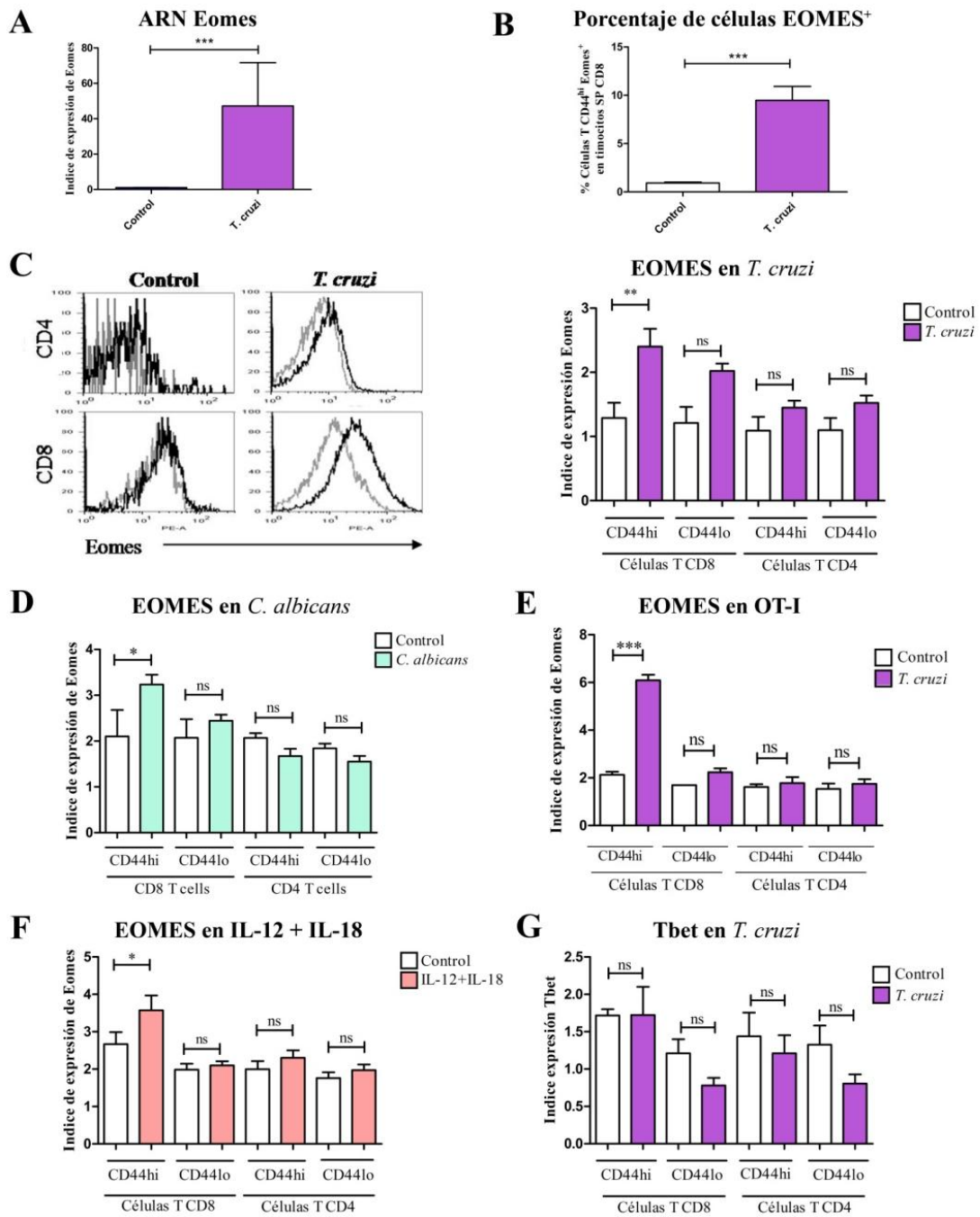
### Expresión de factores de transcripción como Eomes y Tbet en las células T CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> durante procesos infecciosos/inflamatorios

Una de las características principales mencionadas anteriormente de las células CD8 innatas es el aumento de la expresión del factor de transcripción Eomes como consecuencia de la deficiencia de diversas moléculas involucradas en el desarrollo de los linfocitos T como las Tec kinasas. Es por esto que evaluamos la expresión de RNA de Eomes por PCR en tiempo real y observamos una mayor expresión en el timo de animales infectados con *T. cruzi* comparado con los controles sin infectar (Figura 21A). Luego, por ensayos de citometría de flujo intranuclear determinamos la expresión de Eomes en las subpoblaciones de timocitos SP CD8 y CD4 en función de la expresión de CD44. A partir de esta técnica observamos sólo en la subpoblación de timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> un incremento significativo en la expresión de Eomes en los animales infectados comparado con los

animales control y no en las demás subpoblaciones de timocitos SP (Figura 21C). Por otro lado, evaluamos de la misma manera la expresión de Eomes pero en este caso utilizando un modelo de infección con *C. albicans* y obtuvimos resultados similares a la infección con *T. cruzi*, es decir, que existe un incremento significativo en la expresión de Eomes sólo en los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> infectados (Figura 21D). Teniendo en cuenta que en este modelo de infección con *T. cruzi* co-existen en timo células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> tanto específicas para Ags del patógeno como aquellas del linaje innato decidimos evaluar la expresión de este factor de transcripción en los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> pero enfocándonos solamente en aquellas células con un TCR no específico para el patógeno. Para esto utilizamos animales OT-I que presentan una modificación genética que genera linfocitos T CD8<sup>+</sup> con un TCR que reconoce sólo los residuos 257-264 de Ovoalbúmina (OVA) en el contexto de H2Kb, es decir, que en este modelo de infección con *T. cruzi* no se van a desarrollar linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para el patógeno. Pudimos observar que sólo los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> de animales OT-I infectados presentaban una significativa y mayor expresión de Eomes comparado con animales OT-I sin infectar (Figura 21E).

Para evaluar si este fenómeno, al igual que el aumento en el número de timocitos CD44<sup>hi</sup>, ya descrito, podía ser reproducido luego de la expresión de las citoquinas inflamatorias IL-12 + IL-18 y en ausencia del patógeno, evaluamos por citometría de flujo intranuclear la expresión de Eomes pero en timocitos aislados de animales tratados de manera sistémica con IL-12 e IL-18. Obtuvimos un incremento en la expresión de Eomes sólo en la subpoblación de timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> de animales tratados en comparación con los animales control de manera similar a lo observado en los modelos de infección antes mencionados (Figura 21F).

Una característica de las células CD8 innatas es que no incrementan la expresión de otro factor de transcripción de la familia Tbox denominado Tbet como lo hacen las células de memoria convencionales. Determinamos por citometría de flujo intranuclear que la subpoblación de timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> no presentaban diferencias significativas en la expresión de Tbet entre los animales control e infectados con *T. cruzi* (Figura 21G).



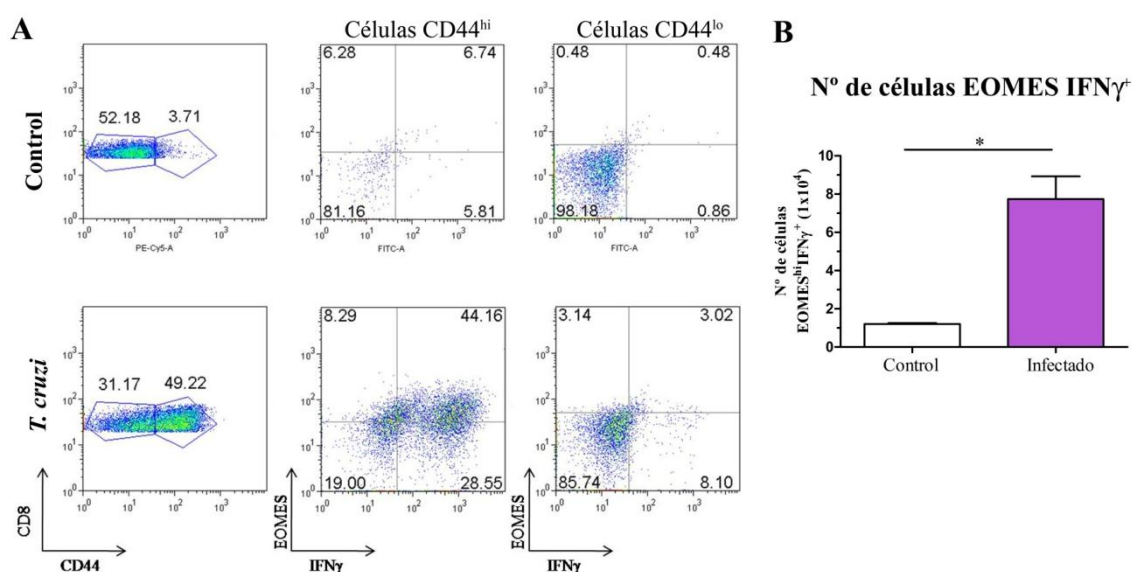
**Figura 21:** Expresión del factor de transcripción Eomes en timocitos CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup>. (A) Se aislaron los timocitos de animales control o infectados con *T. cruzi* y se extrajo el RNA para evaluar por PCR en tiempo real la expresión de EOMES. Se evaluó por citometría de flujo intranuclear, utilizando un anticuerpo anti-Eomes, (B) el porcentaje de células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> EOMES<sup>+</sup> y (C) la expresión de este factor de transcripción en las distintas subpoblaciones de células SP CD4 y SP CD8 aisladas de timo de animales B6 control o WT infectados con *T. cruzi* o (D) WT infectados con *C. albicans* o (E) OT-I infectados con *T. cruzi* o (F) tratados con IL-12 + IL-18. (G) Se evaluó por citometría de flujo intranuclear la expresión del factor de transcripción Tbet en las distintas subpoblaciones de células SP CD4 y SP CD8 aisladas de timo de animales B6 control infectados con *T. cruzi*. En C-G, el valor de índice se obtiene dividiendo el MFI de Eomes versus la MFI del control de isotipo. Los resultados se muestran como la media ± SEM. Los datos son el resultado de al menos 3

repeticiones del mismo experimento con 3-5 animales por grupo. La prueba estadística aplicada fue un ANOVA de una vía y la prueba t de Student. \* p<0,05, \*\* p<0,01 y \*\*\* p<0,001, ns = no significativo.

Estos resultados nos permiten decir que durante condiciones inflamatorias/infecciosas donde hay una gran producción de citoquinas Th1 como IL-12 e IL-18, se observa la presencia en timo de células T CD8<sup>+</sup> con un fenotipo innato y una expresión incrementada del factor de transcripción EOMES (CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> EOMES<sup>+</sup>).

Producción de IFN $\gamma$  de las células T CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> Eomes<sup>+</sup> con características innatas

Evaluamos por citometría de flujo intracelular la capacidad de producción de IFN $\gamma$  en las células T CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> Eomes<sup>+</sup> en condiciones infecciosas. Cultivamos por 5 hs timocitos aislados de animales control o infectados con *T. cruzi* en presencia de un estímulo policlonal como es el acetato de forbol miristato (PMA) más ionomicina o en ausencia de estímulo. Los resultados demostraron que los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> EOMES<sup>+</sup> son los principales productores de IFN $\gamma$  durante condiciones infecciosas/inflamatorias con un aumento significativo con respecto a los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> EOMES<sup>-</sup> (Figura 22).



**Figura 22:** Producción de IFN $\gamma$  en los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> de tipo innatos. Se aislaron los timocitos de animales control o infectados con *T. cruzi* y se cultivaron por 4hs en placas de cultivo con medio completo en presencia de PMA mas ionomicina. Se agregó al medio brefeldina en las últimas 3h de cultivo. Las células fueron resuspendidas, lavadas y se realizó la marcación de superficie e intracelular como se detalla en M&M (A) Se define la estrategia de selección. (B) Gráfico del número absoluto de células CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> EOMES<sup>+</sup> de animales infectados que producen IFN $\gamma$  en comparación con los animales control. Los resultados se muestran

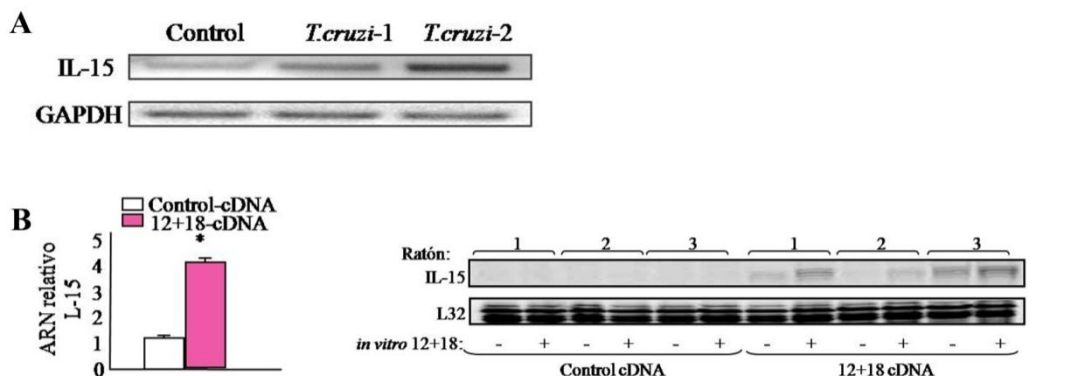
como la media  $\pm$  SEM. Los datos son el resultado de 3 repeticiones del mismo experimento con 3-5 animales por grupo. La prueba estadística aplicada fue un ANOVA de una vía y la prueba t de Student. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ , ns = no significativo.

### Expresión local de IL-15 y de su receptor en timo durante condiciones infecciosas/inflamatorias de tipo Th1

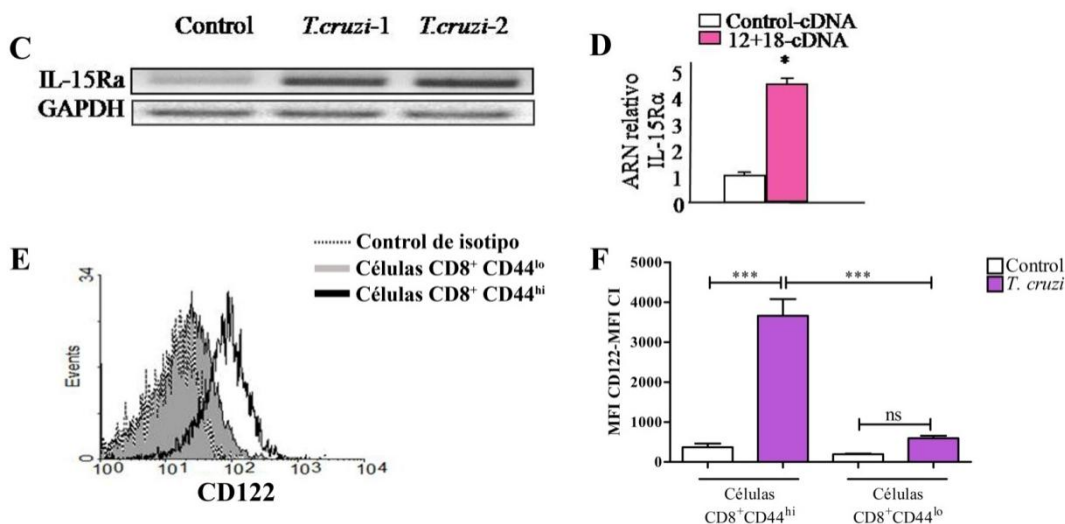
Las células CD8 innatas se diferencian dentro del timo y dependen completamente de IL-15 para su desarrollo o mantenimiento de manera similar a las células NK<sup>[40]</sup>. Eomes, el factor de transcripción característico de las células CD8<sup>+</sup> innatas, es conocido por promover tanto la producción de IFN $\gamma$  como la expresión de CD122 (cadena  $\beta$  del receptor de la IL-15), lo que explicaría su dependencia de dicha citoquina<sup>[40]</sup>. El receptor de IL-15 es una proteína heterotrimérica formada por una cadena  $\alpha$  (IL-15R $\alpha$ ), la cadena  $\beta$  del receptor de IL-2 (CD122) y la cadena  $\gamma$  común del receptor de IL-2, dependiendo de cuales sean las cadenas que se unan para formar el receptor es la afinidad resultante por la citoquina. Si el receptor está formado por la cadena  $\alpha$  sola se une con baja afinidad a IL-15, pero si está formado por las cadenas  $\beta\gamma$  o las tres ( $\alpha\beta\gamma$ ) se une con intermedia o alta afinidad, respectivamente<sup>[59, 60]</sup>. En este contexto decidimos evaluar en nuestro modelo de infección con *T. cruzi* y de inyección hidrodinámica de IL-12 + IL-18 la expresión local de IL-15 con la intención de explicar el incremento de este tipo celular en timo. Por RT-PCR determinamos que hay una significativa expresión de RNA de IL-15 en timo de animales infectados (Figura 23A) como así también en los tratados con IL-12+IL-18 (Figura 23B) mientras que no se observaba dicha expresión en los animales control. También analizamos la expresión de RNA de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-15 en células aisladas de timo de animales infectados con *T. cruzi* o tratados con IL-12+IL-18 y observamos en ambos casos un incremento significativo del IL-15R $\alpha$  en timo en comparación con el control (Figuras 23C y 23D respectivamente). Más específicamente realizamos análisis por citometría de flujo de superficie para determinar en la población de timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> la expresión de la cadena  $\beta$  del receptor de IL-15 (CD122). Observamos en los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> aislados de animales infectados con *T. cruzi* un aumento significativo de la expresión de CD122 en comparación con los timocitos SP CD8 CD44<sup>lo</sup> de los mismos animales (Figura 23E). Podemos decir entonces que durante condiciones inflamatorias/infecciosas los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> expresan ambas cadenas del receptor

de la IL-15 junto con la producción de la citoquina IL-15 dentro del timo lo que podría favorecer el desarrollo de células CD8 innatas.

### Expresión de IL-15



### Expresión de las cadenas $\alpha$ y $\beta$ (CD122) del receptor de IL-15



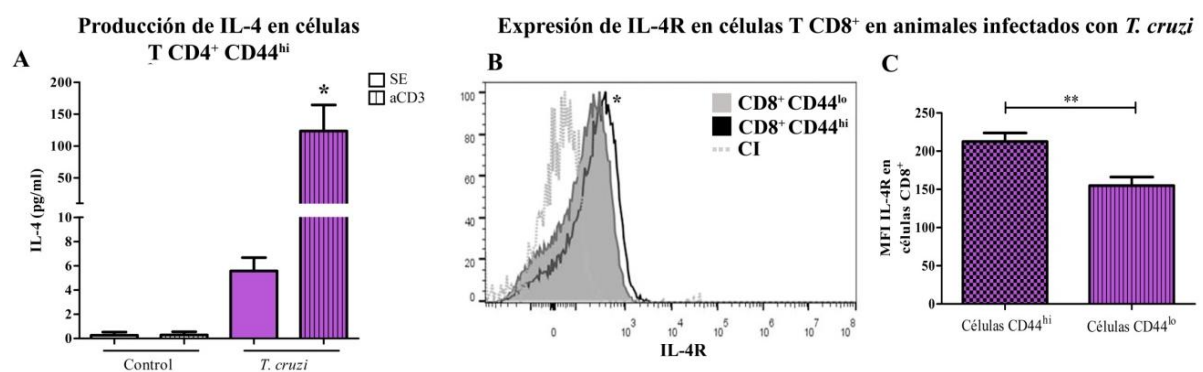
**Figura 23:** Expresión de IL-15 y sus receptores en timo. Se aisló el ARN de los timocitos de animales B6 y se evaluó la expresión de IL-15 en (A) control o infectados con *T. cruzi* por RT-PCR o (B) tratados con IL-12 + IL-18 y re-estimulados *in vitro* con las mismas citoquinas por real time PCR (derecha) o RT-PCR (izquierda). Se evaluó la expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-15 (IL-15R $\alpha$ ) por (C) RT-PCR en timocitos totales aislados de animales infectados con *T. cruzi* o (D) real time PCR en timocitos tratados con IL-12 + IL-18. (E y F) Por estudios de citometría de flujo se evaluó a expresión de la cadena  $\beta$  del receptor de IL-15 conocido como CD122 en timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> comparando con los timocitos SP CD8 CD44<sup>lo</sup> aislados de animales infectados con *T. cruzi*. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM. La prueba estadística aplicada fue la prueba t de Student y un ANOVA de una vía. \* p<0,05, \*\* p<0,01 y \*\*\* p<0,001, ns = no significativo.

### Expresión local de IL-4 y de su receptor en timo durante condiciones infecciosas/inflamatorias de tipo Th1

Se ha descrito que las células CD8 innatas se encuentran favorecidas en animales deficientes en Tec kinasas donde existen niveles incrementados de IL-4 producidas por células NKT o un subtipo recientemente descrito de células SP CD4 CD44<sup>hi</sup> [38, 48, 61-63]. En función de estos hallazgos evaluamos la presencia de células productoras de IL-4 en nuestro modelo de infección con *T. cruzi*. Observamos por citometría de flujo una gran producción de IL-4 en la sub-población de células SP CD4 CD44<sup>hi</sup> en timo de animales infectados con *T. cruzi* comparado con los animales control (Figura 24A).

De manera similar a lo realizado para el IL-15R, evaluamos por citometría de flujo de superficie la expresión del receptor de IL-4. Pudimos determinar que los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> aislados de animales infectados con *T. cruzi* presentan una mayor expresión de IL-4R comparado con los timocitos SP CD8 CD44<sup>lo</sup> (Figura 24B y 24C).

En base a estos resultados podemos inferir que durante condiciones infecciosas/inflamatorias de tipo Th1 se genera en el timo un ambiente enriquecido en las citoquinas IL-4 e IL-15 que podría favorecer el desvío en el desarrollo de los linfocitos T hacia células innatas.

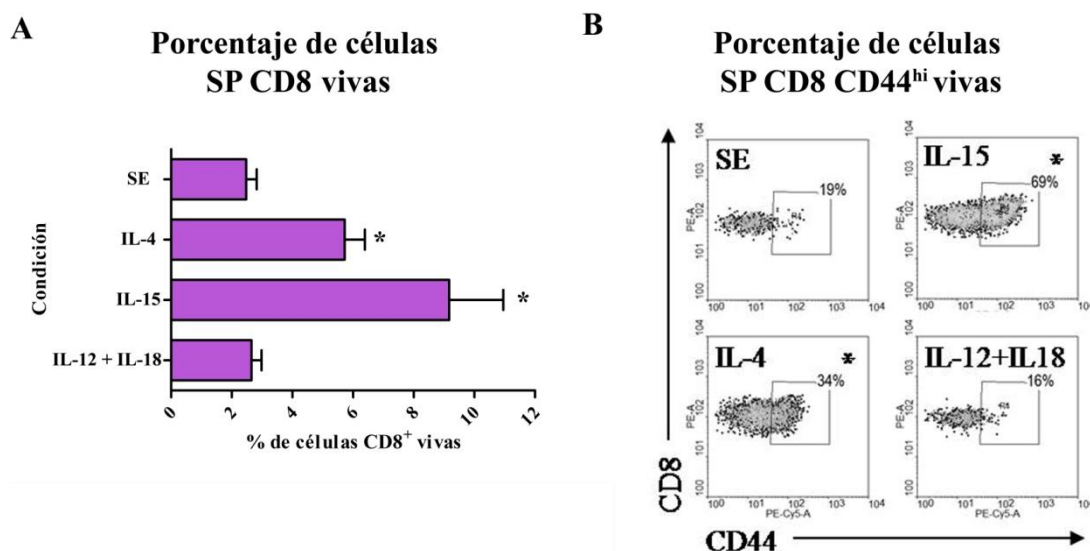


**Figura 24:** Expresión de IL-4 y su receptor en timo. (A) Se aislaron los timocitos de animales B6 control o infectados con *T. cruzi*, se separaron por “cell sorting” las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> en función de la expresión de CD44 (CD44<sup>hi</sup> versus CD44<sup>lo</sup>) y se cultivaron por 24 hs en medio completo en presencia de un anti-CD3. Se realizó un análisis por citometría de flujo utilizando un kit comercial para determinar citoquinas en el sobrenadante de cultivo con perlas marcadas con un fluorocromo (Cytometric Bead Assay). (B) Se evaluó la expresión del receptor de IL-4 (IL-4R) por citometría de flujo en timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> comparando con los timocitos SP CD8 CD44<sup>lo</sup> aislados de animales infectados con *T. cruzi*. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM. La prueba estadística aplicada fue un ANOVA de una vía y la prueba t de Student. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ , ns = no significativo



### Evaluación de la capacidad de las células innatas CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> Eomes<sup>+</sup> para responder a IL-15 e IL-4

Habiendo demostrado que las células T CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup> que hemos caracterizado presentan los receptores para IL-15 e IL-4, a continuación quisimos evaluar su capacidad de responder a dichas citoquinas. Por lo cual diseñamos experimentos *in vitro* de proliferación celular utilizando el colorante CFSE en diferentes condiciones: sin estímulo o estimuladas con las citoquinas recombinantes IL-15, IL-4 o IL-12+IL-18. La Figura 25 demuestra que la sobrevivencia de los timocitos de animales infectados con *T. cruzi* en presencia de rIL-15 o rIL-4 respecto a la condición basal es significativamente mayor en la población de células SP CD8 total (Figura 25A) y específicamente en la sub-población SP CD8 CD44<sup>hi</sup> (Figura 25B).

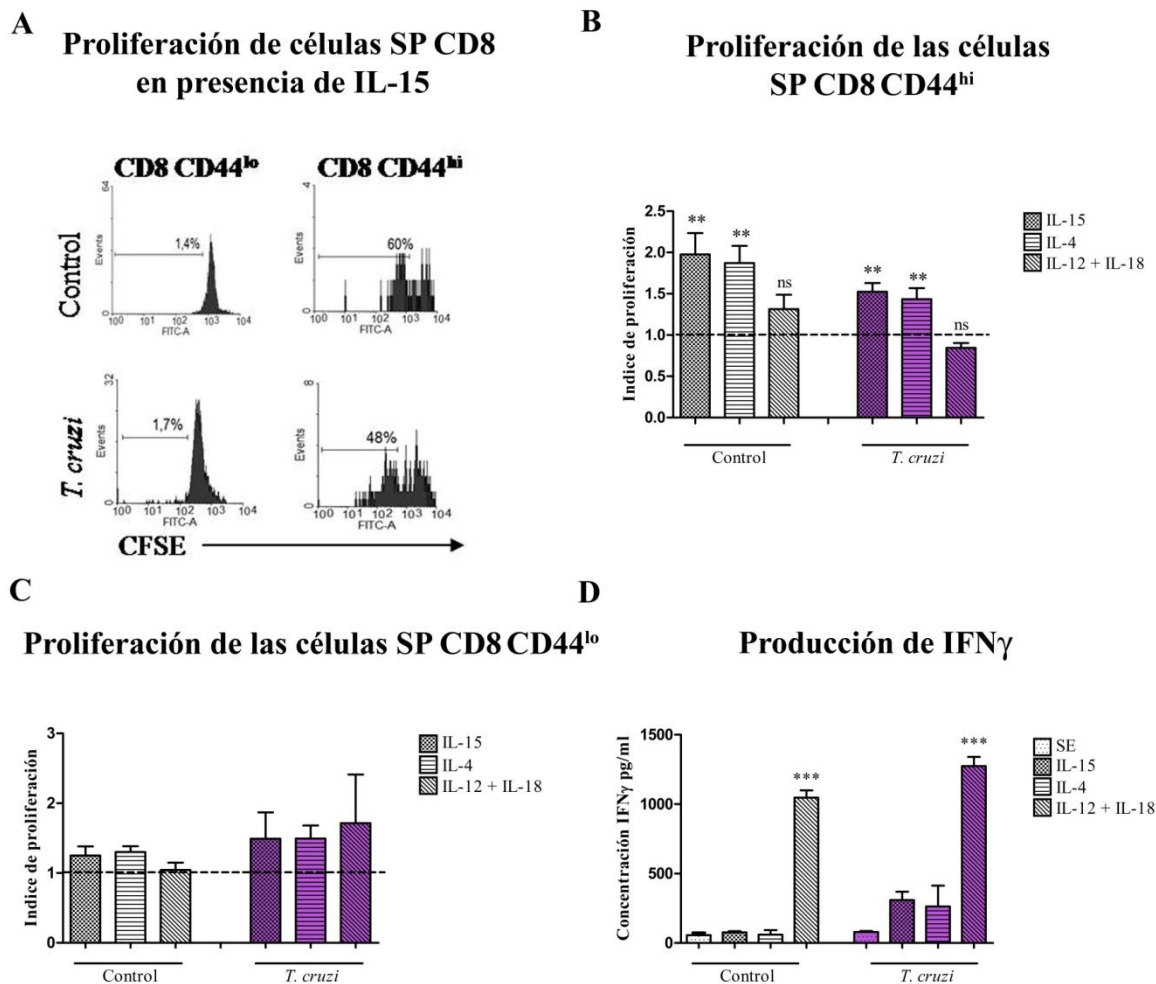


**Figura 25:** Evaluación de la respuesta *in vitro* de timocitos CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> a IL-15, IL-4 e IL-12 + IL-18. Las células aisladas de los timos de animales B6 infectados con *T. cruzi* se tiñeron con CFSE 4  $\mu$ M y después se cultivaron en presencia de 150 ng/ml de rIL-15, 20 ng/ml de rIL-4 o 10 ng/ml de rIL-12 más 50 ng/ml de rIL-18. A las 72 horas de cultivo se analizó por citometría de flujo (A) el porcentaje de timocitos CD8<sup>+</sup> vivos y (B) el porcentaje de timocitos CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> en cada condición. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM. Los datos son el resultado de 3 repeticiones del mismo experimento con 3 animales por grupo. La prueba estadística aplicada fue un ANOVA de una vía.\*  $p < 0,05$ .

En cuanto al análisis de la proliferación, pudimos determinar que las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> de timo tanto de los animales control como infectados son capaces de proliferar en presencia de rIL-15 e rIL-4 (Figura 26A y 26B) y no así la población de timocitos SP CD8 CD44<sup>lo</sup> (Figura 26C). Por otro lado, las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> no proliferaron en presencia

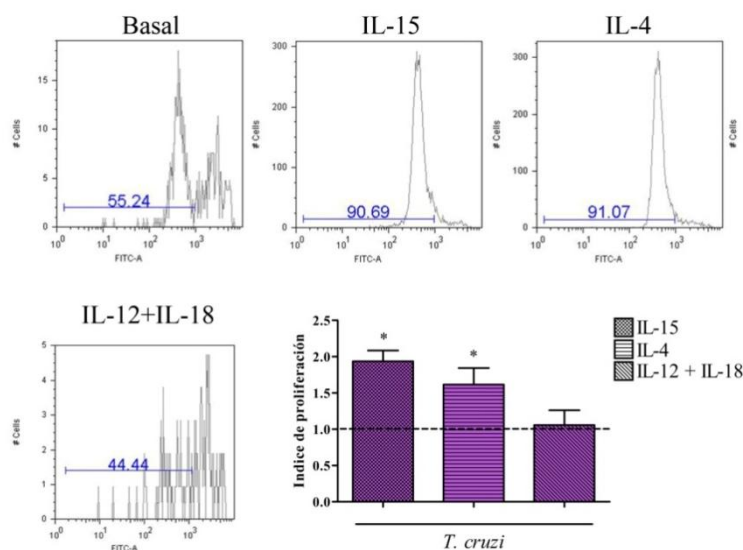


de IL-12+IL-18 (Figura 26B), pero si fueron capaces de producir grandes cantidades de IFN $\gamma$  en los cultivos estimulados con IL-12+IL18 y respecto al estímulo con las citoquinas rIL-4 e rIL-15 (Figura 26D).



**Figura 26:** Proliferación *in vitro* de timocitos CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup>. Las células aisladas de los timos de animales B6 control o infectados con *T. cruzi* se tiñeron con CFSE 4  $\mu$ M y después se cultivaron en presencia de 150 ng/ml de rIL-15, 20 ng/ml de rIL-4 o 10 ng/ml de rIL-12 más 50 ng/ml de rIL-18. A las 72 horas de cultivo se realizó un análisis por citometría de flujo y se calculó el índice de proliferación como el cociente entre la dilución de CSFE de las células estimuladas y las no estimuladas en ratones B6 control o infectados en las subpoblaciones celulares en (A y B) CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> y (C) CD8<sup>+</sup> CD44<sup>lo</sup>. La línea de puntos representa el valor de la proliferación basal. (D) Producción de IFN $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo en cada una de las condiciones de estudio por ELISA. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM. Los datos son el resultado de 3 repeticiones del mismo experimento con 3 animales por grupo. La prueba estadística aplicada fue un ANOVA de una vía. \* p<0,05, \*\* p<0,01 y \*\*\* p<0,001, ns = no significativo.

Debido a que dentro del total de las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> se encuentran células específicas para *T. cruzi*, realizamos el mismo diseño experimental de cultivo celular pero en este caso utilizamos timocitos aislados de animales OT-I infectados con *T. cruzi* para evaluar la respuesta a estos estímulos sólo en las células CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> innatas no específicas del patógeno en particular. En forma similar pudimos observar que las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> presentan una mayor proliferación en presencia de rIL-15 o rIL-4, pero no en presencia de IL-12+IL-18 (Figura 27).



**Figura 27:** Proliferación de las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> OTI<sup>+</sup>. Las células aisladas de los timos de animales B6 OTI infectados con *T. cruzi* se tiñeron con CFSE 4  $\mu$ M y después se cultivaron en presencia de 150 ng/ml de rIL-15, 20 ng/ml de rIL-4 o 10 ng/ml de rIL-12 más 50 ng/ml de rIL-18. A las 72 horas de cultivo se calculó el índice de proliferación como en figura 26 de las células CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>, como el cociente entre la dilución de CFSE de las células estimuladas y las no estimuladas. En línea de puntos se observa el valor representativo de la proliferación basal. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM. Se utilizaron 3 animales. La prueba estadística aplicada fue la prueba t de Student. \* p<0,05.

## CONCLUSIONES CAPITULO II

En este capítulo de resultados se describe la caracterización de las células SP CD8 presentes en timo en base a los criterios establecidos en la literatura sobre el fenotipo de células CD8<sup>+</sup> innatas bajo diferentes condiciones infecciosas/inflamatorias con un fuerte componente de tipo Th1 como son los modelos experimentales con *T. cruzi* o *C. albicans* o la inyección hidrodinámica de IL-12 + IL-18.

- ✓ En estas condiciones las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> que se encuentran en timo presentan un perfil fenotípico característico de las células CD8<sup>+</sup> innatas, es decir, el TCR está compuesto por las cadenas  $\alpha\beta$ , tienen una expresión intermedia de CD69, CD62L y IL-7R, una alta expresión de CD122 y no expresan CXCR3.
- ✓ Determinamos que en los tres modelos infecciosos/inflamatorios estudiados se observa un incremento significativo de la molécula CMH-Ib no clásica llamada Qa2 respecto a un timo control, con niveles similares a los obtenidos en OLS. Esto nos permite especular que, al menos en nuestras condiciones experimentales, el microambiente tímico adquiere un fenotipo propicio para el desarrollo de células T CD8<sup>+</sup> innatas.
- ✓ A su vez en donde hay una elevada producción de citoquinas Th1 como IL-12 e IL-18, se observa la presencia en timo de células T CD8<sup>+</sup> con un fenotipo innato caracterizado por una expresión incrementada del factor de transcripción EOMES (CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> EOMES<sup>+</sup>).
- ✓ Los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup>EOMES<sup>+</sup> son los principales productores de IFN $\gamma$  durante condiciones infecciosas/inflamatorias con un aumento significativo con respecto a los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup>EOMES<sup>-</sup>.
- ✓ Los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> expresan ambas cadenas del receptor de la IL-15 y del receptor de IL-4 que junto con la elevada producción de ambas citoquinas dentro del timo podrían estar favoreciendo la aparición de estas células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> EOMES<sup>+</sup> innatas.
- ✓ Las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> presentes en timo tanto de los animales control como infectados son capaces de proliferar en presencia de rIL-15 e rIL-4 y producir IFN $\gamma$  al ser estimuladas con IL-12+IL18, de manera Ag-independiente (OT-I).

En conjunto estos resultados indican que durante condiciones infecciosas/inflamatorias de tipo Th1 se genera en timo un microambiente propicio para

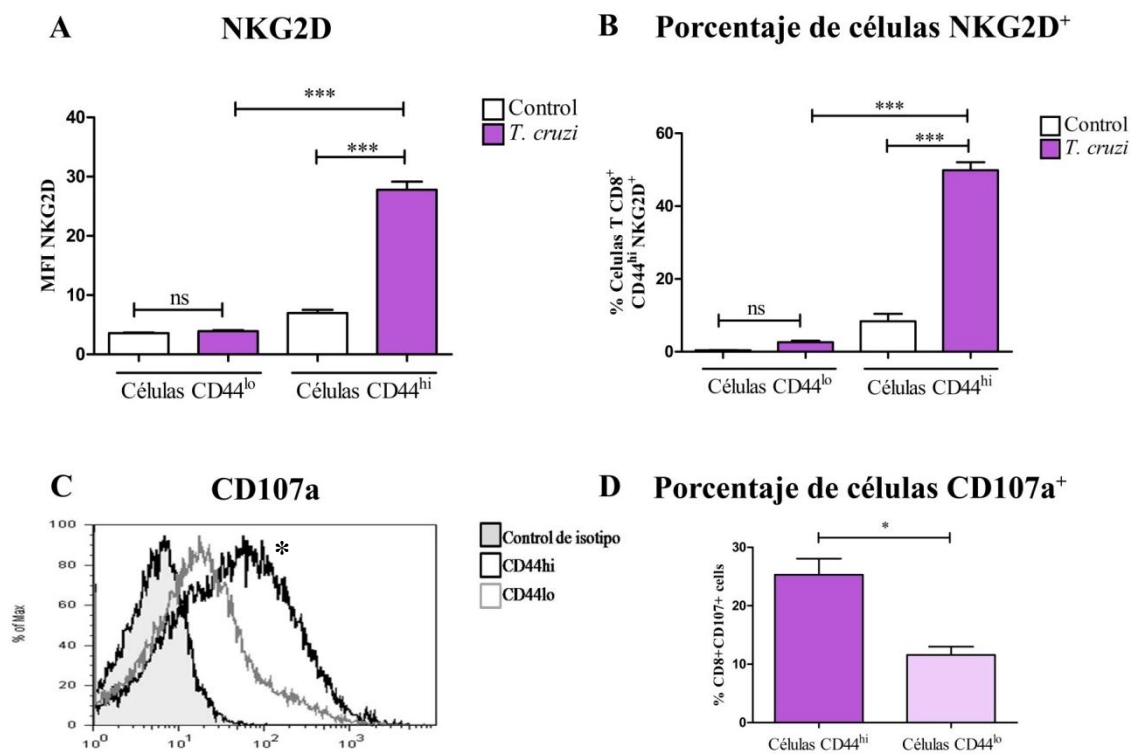
diferenciación de células innatas caracterizado por la expresión de la molécula MHC-Ib no clásica Qa2 y la producción local de IL-4 e IL-15. Más aún, las células CD8<sup>+</sup> innatas tímicas (SP CD8 CD44<sup>hi</sup> EOMES<sup>+</sup>) son capaces de proliferar frente a las citoquinas IL-4 e IL-15 y producir altos niveles de IFN $\gamma$  en respuesta a IL-12 + IL-18 acorde a lo descrito por otros autores respecto a estas células.

### **CAPÍTULO III: CAPACIDAD PROTECTIVA DE LAS CÉLULAS SP CD8 INNATAS GENERADAS EN TIMO DURANTE PROCESOS INFECCIOSOS/INFLAMATORIOS SISTÉMICOS DE TIPO TH1.**

#### Evaluación de la capacidad funcional de las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> innatas

Habiendo determinado que las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> que se encuentran en timo durante condiciones infecciosas/inflamatorias de tipo Th1 son células con fenotipo T CD8<sup>+</sup> innatas, decidimos a continuación evaluar su capacidad funcional, es decir, si presentan una función efectora que les permita desempeñar un rol protectorio durante estos procesos. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son células citotóxicas capaces de liberar tanto citoquinas inflamatorias como IFN $\gamma$  o TNF $\alpha$ , como así también gránulos que contienen perforinas y granzimas que provocan la lisis de las células blanco. Cuando una célula CD8 degranula, expresa en la superficie la molécula CD107a que es una glicoproteína de transmembrana que reside en la membrana lisosomal/endosomal y puede expresarse en la superficie de las células T CD8<sup>+</sup> y NK de forma transitoria (ya que se internaliza rápidamente por la vía endocítica).

Además, uno de los mecanismos reportados de citotoxicidad de las células CD8<sup>+</sup> innatas es a través del receptor NKG2D (más comúnmente observado en células NK) que es una proteína de transmembrana que cuando se une a su contraparte en las células blanco es capaz de ejercer una actividad citolítica<sup>[53]</sup>. Acorde a lo descripto, evaluamos la expresión de NKG2D por citometría de flujo y observamos que los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> de animales infectados con *T. cruzi* presentan un incremento tanto en la intensidad de expresión de este receptor como en el porcentaje de células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> NKG2D<sup>+</sup> comparado con la misma sub-población de los animales del grupo control (Figura 28A y 28B respectivamente). A su vez, una forma de evaluar si una célula CD8<sup>+</sup> posee capacidad citotóxica, es determinar la expresión de CD107a. Para ello aislamos timocitos de animales infectados con *T. cruzi* y los cultivamos en presencia de PMA más ionomicina por 5 hs para estimular la activación y degranulación. Por citometría de flujo observamos que las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> tenían tanto una mayor expresión de CD107a como un mayor porcentaje de células que lo expresaban respecto a los timocitos SP CD8 CD44<sup>lo</sup> (Figura 28C y 28D respectivamente). En base a estos resultados, podemos inferir que las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> encontradas en timo en condiciones infecciosas/inflamatorias, tienen una alta capacidad de liberar gránulos junto a una elevada expresión del receptor citolítico NKG2D, lo que demostraría un gran potencial citotóxico.

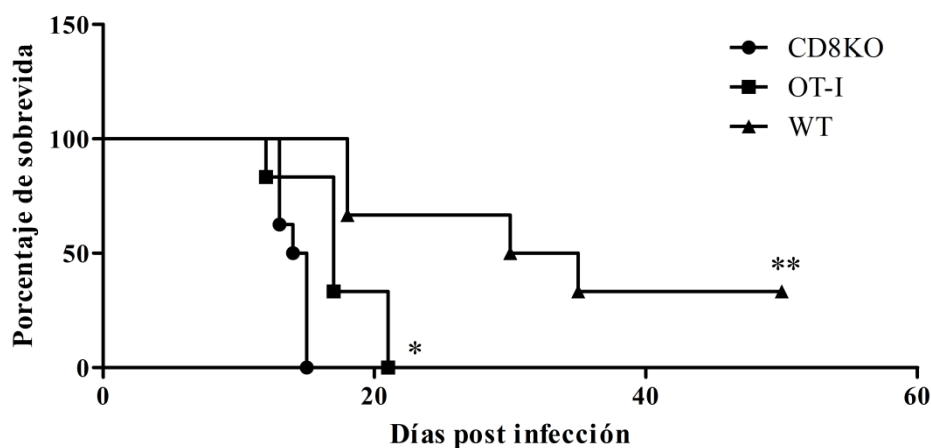


**Figura 28:** Expresión de NKG2D y CD107a en las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> innatas. Se aislaron timocitos de animales B6 control o infectados con *T. cruzi* al día 14 dpi. (A-B) Se realizó un ensayo de citometría de flujo para evaluar tanto la expresión (MFI) del marcador de activación NKG2D como el porcentaje de células NKG2D<sup>+</sup> en las dos subpoblaciones de timocitos SP CD8 (CD44<sup>hi</sup> versus CD44<sup>lo</sup>) respectivamente. (C- D) Se cultivaron los timocitos por 4hs en presencia de PMA más ionomicina más brefeldina en medio completo y luego se realizó un ensayo de citometría de flujo para evaluar tanto la expresión (MFI) del marcador de degranulación CD107a como el porcentaje de células CD107a<sup>+</sup> en las dos subpoblaciones de timocitos SP CD8 (CD44<sup>hi</sup> versus CD44<sup>lo</sup>) respectivamente. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM. Los datos son el resultado de 2 repeticiones del mismo experimento con 3-5 animales por grupo. La prueba estadística aplicada fue un ANOVA de una vía y la prueba t de Student respectivamente. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ , ns: no significativo.

### Evaluación de la capacidad protectora de los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> innatos

A partir de los resultados obtenidos con respecto a la capacidad citotóxica de las células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> en el apartado anterior, decidimos indagar sobre la capacidad protectora *in vivo* de dichas células innatas. Sin embargo, antes de proponer experimentos de transferencia adoptiva, decidimos evaluar si las células T CD8<sup>+</sup> tienen un rol importante en

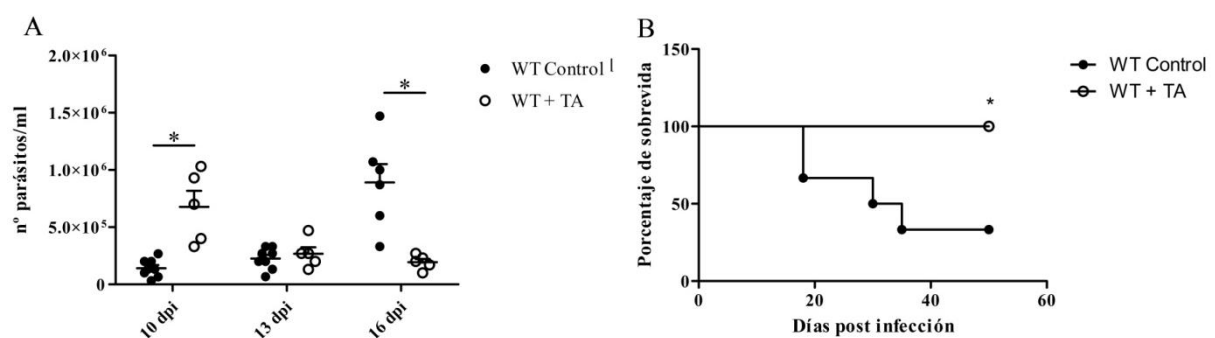
la sobrevivencia de animales infectados con dosis sub-letales (5000 tripomastigotes) de *T. cruzi*. Para ello, infectamos ratones deficientes en células T CD8<sup>+</sup> (CD8KO) y observamos que todos los ratones mueren alrededor del día 18 post-infección respecto a los WT que mantienen una sobrevivencia total del 30% hasta 50 días post-infección (Figura 29). Además, se observó que ratones transgénicos para el TCR, OT-I, que sólo disponen de células T CD8<sup>+</sup> con un TCR único no específico para el patógeno, presentan mayor sobrevivencia que los animales CD8KO (Figura 29). Estos datos no sólo son relevantes respecto al rol protector de las células T CD8<sup>+</sup> en el curso de la infección con *T. cruzi*, sino que también demuestran que células T CD8<sup>+</sup> con un TCR no específico para el patógeno (ratones OT-I) pueden colaborar en el control de la infección de manera Ag-independiente como se ha reportado para células innatas en otros modelos infecciosos [49, 50, 53, 54, 64].



**Figura 29:** Comparación de la sobrevivencia entre diferentes cepas animales frente a la infección con *T. cruzi*. Se infectaron ratones de la cepa B6 WT, OT-I o CD8 $\alpha$ KO con 5000 parásitos de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen y se monitoreó su sobrevivencia hasta el 50 dpi. En el gráfico se muestra el porcentaje de sobrevivencia en función de los días post-infección para cada cepa. Los datos son el resultado de 2 repeticiones del mismo experimento con 6-8 animales por grupo. Los resultados se analizaron con el test Gehan-Brelow-Wilcoxon. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01.

En base a estos resultados, planteamos diferentes experimentos *in vivo* para evaluar el rol protector de las células CD8<sup>+</sup> innatas tímicas en el curso de la infección con *T. cruzi*. Para ello transferimos adoptivamente timocitos aislados de animales infectados con *T. cruzi* a un grupo receptor (grupo transferido), que fueron desafiados con 5000 parásitos de *T. cruzi* para evaluar la sobrevivencia y parasitemia durante un periodo de 50 días (esquema detallado en la figura 37 de la sección de materiales y métodos). Como grupo control utilizamos animales que sólo fueron infectados con la misma carga parasitaria. Sorprendentemente los animales del grupo transferido presentaron una mayor parasitemia que el grupo control al día 10 post-

infección, sin embargo fueron capaces de controlarla rápidamente ya que a los días 13 y 16 post-infección disminuyó la parasitemia, mientras que en el grupo control fue aumentando en el mismo periodo evaluado (Figura 30A). Esto puede explicarse con los resultados descritos en la figura 16 donde describimos que *T. cruzi* se encontraba en el timo y por ende podrían transferirse junto con los timocitos, generando una mayor parasitemia inicial en el grupo transferido con respecto al control. A pesar de la mayor parasitemia, observamos que el grupo transferido presentó una mayor sobrevida con respecto al grupo control, demostrando un rol protector de los timocitos transferidos provenientes de animales infectados con *T. cruzi* (Figura 30B).

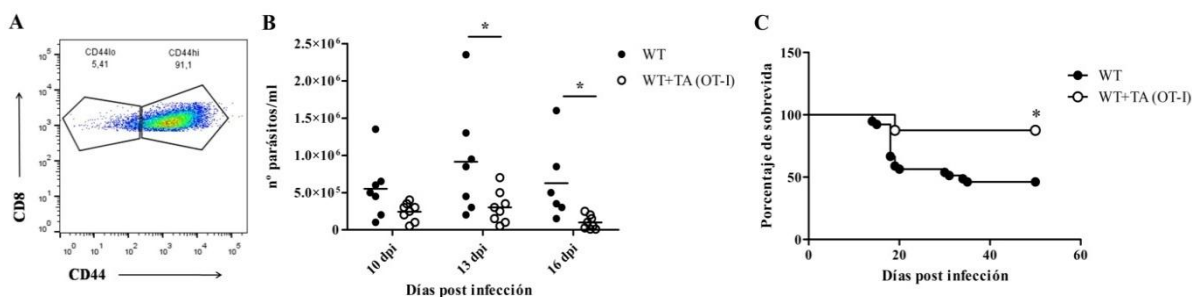


**Figura 30:** Evaluación del rol protector de timocitos enriquecidos en células CD8<sup>+</sup> innatas en la infección con *T. cruzi*. Se aislaron timocitos de animales B6 infectados con *T. cruzi* en el día 14 pi.  $6 \times 10^6$  timocitos (en 100  $\mu$ l de solución fisiológica) fueron transferidos adoptivamente (TA) a un grupo de animales B6 (grupo WT+TA) por inyección retro-orbital. Luego de la TA el grupo receptor fue infectado con 5000 parásitos de *T. cruzi*. Como grupo control se utilizaron animales B6 que sólo recibieron la infección con 5000 parásitos (WT Control). (A) En el gráfico se muestra el n° de parásitos/ml de sangre a distintos días post-infección. (B) Se grafica el porcentaje de sobrevida de los dos grupos de trabajo hasta el día 50 post-infección. Los datos son el resultado de 3 repeticiones del mismo experimento con 6-8 animales por grupo. Los resultados de parasitemia se analizaron con un ANOVA de una vía y los datos de sobrevida fueron analizados con el test Gehan-Brelow-Wilcoxon. \*  $p < 0,05$ .

Teniendo en cuenta que la transferencia de timocitos totales de ratones infectados con *T. cruzi* incluye también la transferencia de células específicas para el patógeno según se detalla en la figura 17, diseñamos experimentos de sobrevida pero transfiriendo timocitos aislados de animales OT-I infectados con *T. cruzi*. En este caso los timocitos aislados de animales OT-I infectados con *T. cruzi* en el día 14 pi se sometieron a separación celular por la técnica de “cell sorting” para obtener sólo los timocitos SP CD8 que luego fueron transferidos adoptivamente a animales B6 WT receptores desafiados con 5000

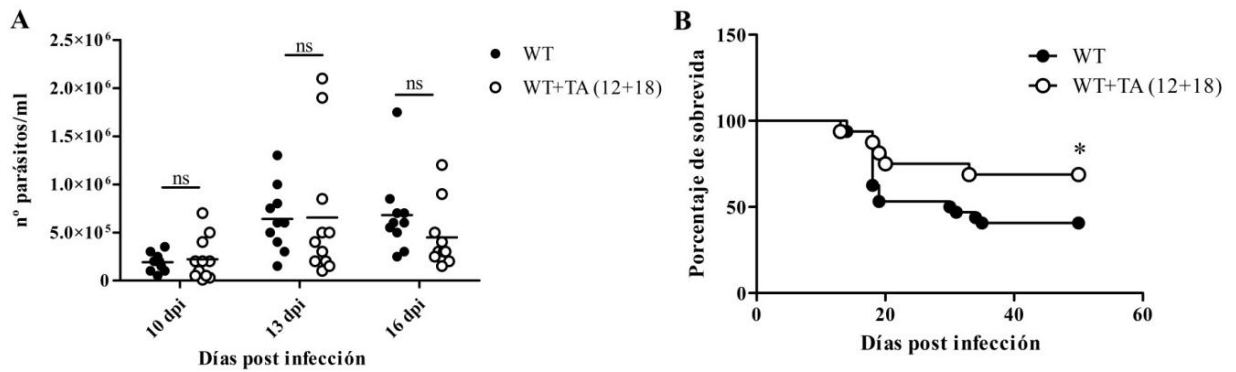


parásitos de *T. cruzi*. Estas células SP CD8 OT-I están altamente enriquecidas en células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> (Figura 31A). Comparando con el grupo control (animales infectados con *T. cruzi* que no recibieron TA) pudimos observar que el grupo que recibió la TA de células SP CD8 OT-I presenta tanto una menor parasitemia, que va disminuyendo en los días subsiguientes evaluados (Figura 31B), como también un significativo incremento en la sobrevivida (Figura 31C). Estos resultados indicarían que las células T CD8<sup>+</sup> innatas presentan un rol protectoro durante la infección con *T. cruzi* independientemente de su especificidad antigénica.



**Figura 31:** Evaluación del rol protectoro frente a *T. cruzi* luego de la TA de timocitos enriquecidos en células CD8<sup>+</sup> innatas de animales OT-I infectados con *T. cruzi*. Se obtuvieron los timocitos SP CD8 de animales OT-I al día 14 post-infección con *T. cruzi* por “cell sorter”. 5x10<sup>5</sup> timocitos SP CD8 (en 100 µl de solución fisiológica) obtenidos fueron TA a un grupo de animales B6 (grupo WT+TA) por inyección retro-orbital. Luego de la TA el grupo receptor fue infectado con 5000 parásitos de *T. cruzi*. Como grupo control se utilizaron animales B6 que sólo recibieron la infección con 5000 parásitos (WT Control). (A) Se muestra un gráfico de puntos representativo de la distribución de la población SP CD8 transferida en función de CD44, obtenido por citometría de flujo. (B) En el gráfico se muestra el n° de parásitos/ml en sangre a distintos días post-infección. (C) Se grafica el porcentaje de sobrevivida de los dos grupos de trabajo hasta el día 50 post-infección. Los datos son el resultado de 2 repeticiones del mismo experimento con 6-8 animales por grupo. Los resultados de parasitemia se analizaron con un ANOVA de una vía y los datos de sobrevivida fueron analizados con el test Gehan-Brelow-Wilcoxon. \* p<0,05.

Para reforzar nuestra hipótesis del rol protectoro de las células CD8<sup>+</sup> innatas, en este caso en ausencia de cualquier estímulo antigénico mediado por la presencia del patógeno, transferimos adoptivamente timocitos de animales tratados sistémicamente con IL-12 + IL-18, altamente enriquecidos en células CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> innatas. En este caso no observamos diferencias significativas en la parasitemia a ningún tiempo post-infección (Figura 32A), pero sí una mayor sobrevivida del grupo transferido con respecto al control (Figura 32B).



**Figura 32:** Evaluación del rol protectoro frente a *T. cruzi* luego de la TA de timocitos enriquecidos en células CD8+ innatas de animales tratados con IL-12 + IL-18. Se aislaron al día 7 post-tratamiento, timocitos de animales B6 inyectados hidrodinámicamente con los plásmidos de expresión de IL-12 e IL-18. Alrededor de  $10 \times 10^6$  timocitos (en 100  $\mu$ l de solución fisiológica) fueron TA a un grupo de animales B6 (grupo WT+TA 12+18) por inyección retro-orbital. Luego de la TA el grupo receptor fue infectado con 5000 parásitos de *T. cruzi*. Como grupo control se utilizaron animales B6 que sólo recibieron la infección con 5000 parásitos (WT). (A) En el gráfico se muestra el n° de parásitos/ml en sangre a distintos días post-infección. (B) Se grafica el porcentaje de supervivencia de los dos grupos de trabajo hasta el día 50 post-infección. Los datos son el resultado de 3 repeticiones del mismo experimento con 6-8 animales por grupo. Los resultados de parasitemia se analizaron con un ANOVA de una vía y los datos de supervivencia fueron analizados con el test Gehan-Brelow-Wilcoxon. \*  $p < 0,05$ , ns: no significativo.

### CONCLUSIONES CAPITULO III

En este tercer capítulo se describe la capacidad funcional de las células CD8<sup>+</sup> innatas encontradas en timo bajo circunstancias infecciosas/inflamatorias de tipo Th1 que cursan con una gran producción de IL-12 + IL-18 en la etapa aguda. Los resultados presentados nos permiten concluir que:

- ✓ Los timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> que se generan en condiciones infecciosas/inflamatorias tienen una mayor expresión del receptor citolítico NKG2D y de la molécula CD107a, lo que demuestra una mayor capacidad citotóxica respecto a los timocitos SP CD8 CD44<sup>lo</sup>, moléculas a través de las cuales podría mediar la muerte de las células blanco.
- ✓ Las células T CD8<sup>+</sup> juegan un rol crítico en el control de la infección con *T. cruzi* ya que ratones deficientes en células T CD8<sup>+</sup> presentan una menor sobrevivencia con respecto a ratones WT u OT-I infectados.
- ✓ Las células CD8<sup>+</sup> innatas (SP CD8 CD44<sup>hi</sup>Eomes<sup>+</sup>) protegen contra *T. cruzi* de manera independiente del Ag ya que, tanto timocitos SP CD8 innatos de ratones OT-I infectados como timocitos SP CD8 obtenidos de ratones inyectados con IL-12 + IL-18 incrementaron la sobrevivencia de los animales receptores frente a la infección con *T. cruzi*.

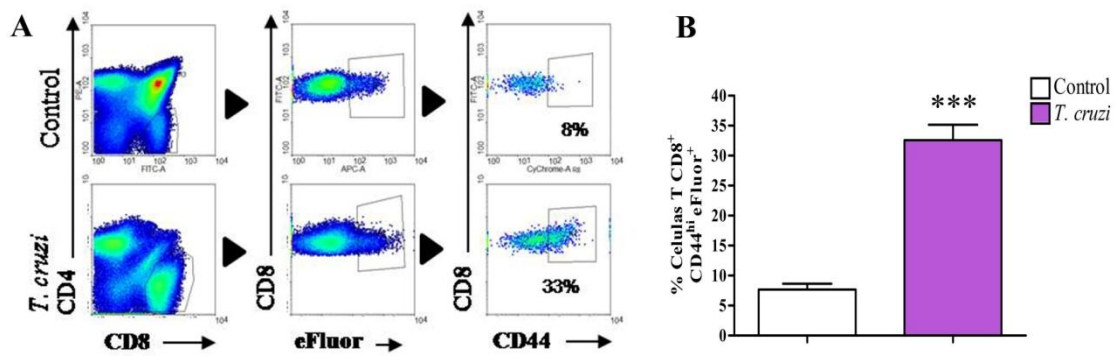
En conjunto estos resultados sugieren un rol protector de las células CD8<sup>+</sup> innatas de timo en la etapa aguda de procesos infecciosos/inflamatorios de tipo Th1, como la infección por *T. cruzi*, rol que hasta este momento en la bibliografía se había reportado solo para patógenos como bacterias y virus [49, 50, 53, 54, 64] o en modelos murinos de cáncer [51, 55, 56].

## CAPITULO IV: MECANISMOS RESPONSABLES DE LOS CAMBIOS EN LA DECISIÓN DE LINAJE DE TIMOCITOS SP CD8 (CONVENCIONAL A INNATA) DURANTE CONDICIONES SISTEMICAS INFECCIOSAS/INFLAMATORIAS TH1

### Influencia del ambiente infeccioso/inflamatorio tipo Th1 en la generación de las células CD8<sup>+</sup> innatas

En los resultados previamente expuestos determinamos que, durante condiciones infecciosas/inflamatorias de tipo Th1, en el timo se encuentran presentes células SP CD8 CD44<sup>hi</sup> innatas. Lo que no hemos demostrado hasta este punto, es si este subtipo celular se está generando dentro del timo o si son células innatas que ingresan desde la periferia, ya que resultados previamente publicados por nuestro grupo demostraron un arribo de células T CD44<sup>hi</sup> desde periferia al timo en los modelos experimentales infecciosos/inflamatorios planteados<sup>[13]</sup>. Si bien las cantidades que arriban al timo desde OLP son muy pequeñas en relación a los altos porcentajes de células con fenotipo innato que encontramos en timo en estas circunstancias, todos esos modelos no son estáticos y la recirculación de células empaña los resultados<sup>[13]</sup>. Por lo tanto, para aislarnos de las células que recirculan al timo y concentrarnos en las células residentes y en las moléculas que intervienen en la diferenciación de las células innatas, hemos diseñado distintas estrategias experimentales que nos permitan evidenciar el mecanismo que opera.

En primer lugar, realizamos experimentos *in vivo* en donde inyectamos de manera intratímica el colorante eFluor para teñir las células del timo y diferenciar así las células residentes (eFluor<sup>+</sup>) de aquellas de periferia que pueden ingresar al timo en condiciones infecciosas/inflamatorias tipo Th1. La inyección fue realizada en un grupo de animales control y en un grupo de animales infectados con *T. cruzi* en el día 7 post-infección. Este tiempo se eligió porque previamente determinamos, por citometría de flujo, que para tal día aún no se ha iniciado el desarrollo de las células innatas ni el ingreso de las que recirculan desde OLS. A ese período de tiempo, los timos son idénticos a los controles tanto en tamaño como en componentes celulares y podemos afirmar que se están tiñendo sólo los timocitos residentes. Los resultados demostraron un aumento significativo en el porcentaje de timocitos SP CD8 CD44<sup>hi</sup> eFluor<sup>+</sup> en los animales infectados, es decir, que un gran porcentaje de timocitos residentes CD8<sup>+</sup> que al día 7 pi (momento de la tinción) eran CD44<sup>lo</sup> y se marcaron con CFSE adquirirían una mayor expresión de CD44 convirtiéndose en timocitos CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup>, en los animales infectados y no en los controles (Figura 33A y 33B).

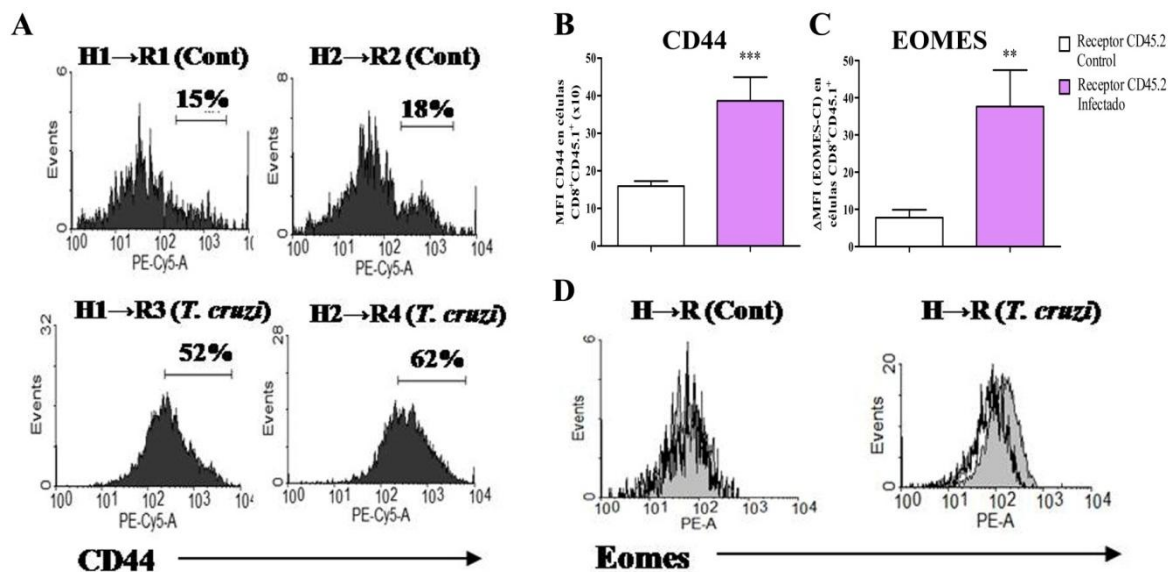


**Figura 33:** Determinación de la conversión de células SP CD8 CD44<sup>lo</sup> a CD44<sup>hi</sup> por ensayos de inyección intratímica con eFluor. Animales B6 control o infectados con *T. cruzi* al 7dpi, previamente anestesiados, fueron inyectados con 8  $\mu$ l del colorante eFluor (0,5mM) directamente en el timo. Luego de 7 días post cirugía los animales fueron sacrificados. Se extrajeron los timocitos y por citometría de flujo se evaluaron aquellos eFluor<sup>+</sup> marcando además: CD8, CD4 y CD44. (A) Estrategia de selección utilizada para el análisis en gráficos de puntos representativos de un animal control y otro infectado. (B) Porcentaje de células eFluor<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> en timo de animales control vs infectados. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SEM. Los datos son el resultado de 3 repeticiones del mismo experimento con 3-5 animales por grupo. La prueba estadística aplicada fue la prueba t de Student. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

Con el objetivo de validar estos resultados utilizando otras estrategias experimentales, realizamos nuevos experimentos de inyección intratímica pero en lugar de utilizar un colorante, inyectamos timocitos de animales WT CD45.1 (CD44<sup>lo</sup> Eomes<sup>-</sup>) directamente en el timo de animales receptores CD45.2 controles o infectados con *T. cruzi* en el día 13 dpi y evaluamos a las 48 hs la expresión de CD44 y Eomes en la población SP CD8 en las células blanco inyectadas (CD45.1). Estos experimentos nos permitieron evaluar si el microambiente tímico es importante para la desviación de la diferenciación de células T convencionales a innatas. Como se muestra en la figura 34, los timocitos SP CD8 CD45.1<sup>+</sup> encontrados en el timo de animales infectados con *T. cruzi* presentan un incremento en la expresión de CD44 (Figura 34A y 34B) en comparación a los respectivos timocitos encontrados en el timo de animales control. Además, estos timocitos SP CD8 CD45.1<sup>+</sup> incrementaron la expresión de Eomes sólo en los animales infectados y no así en los controles (Figura 34C y D).

A partir de estos resultados, podemos decir que el microambiente tímico que se genera durante procesos inflamatorios/infecciosos tipo Th1 permite la desviación del linaje

de timocitos SP CD8 convencionales a innatos, ya que los timocitos incrementan la expresión tanto de CD44 como del factor de transcripción Eomes.



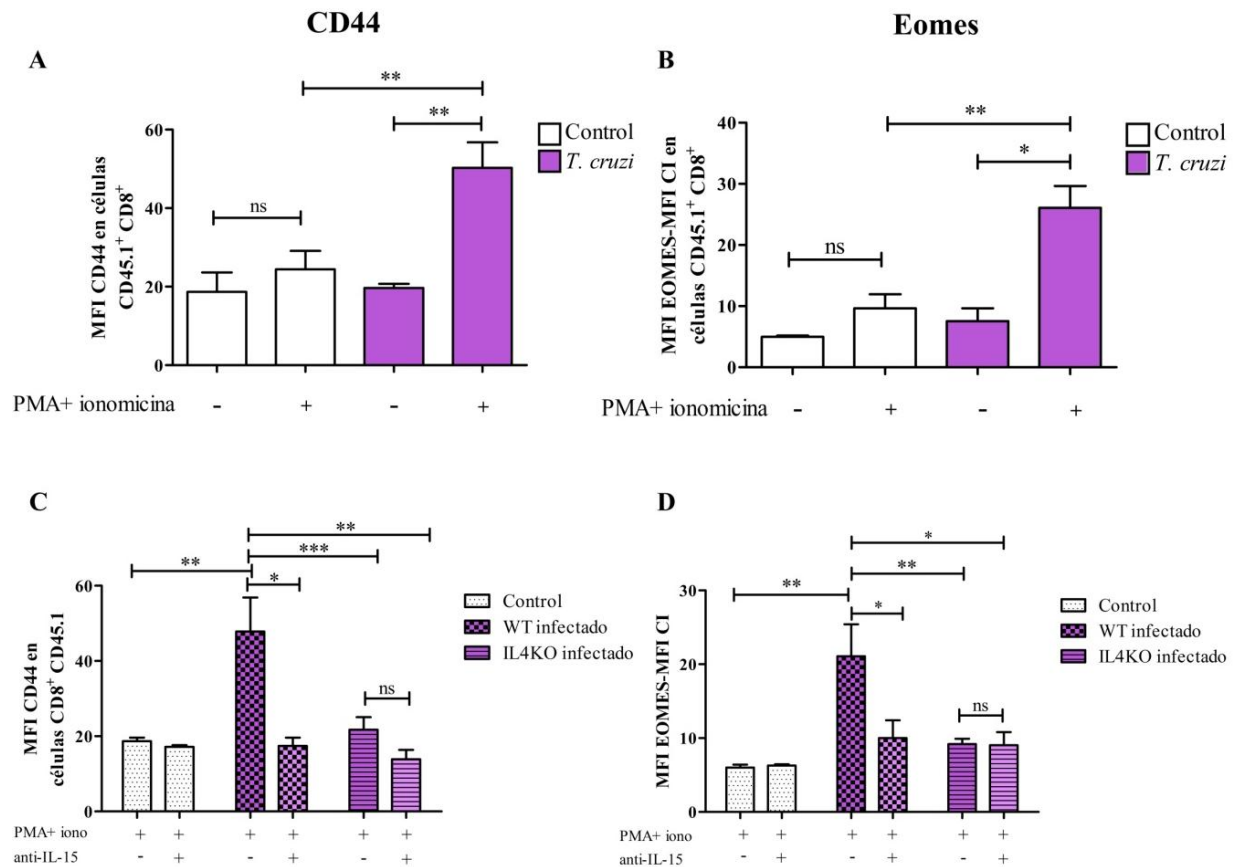
**Figura 34:** Evaluación de la incidencia del microambiente tímico en el fenotipo de timocitos inyectados en forma intratímica en animales receptores. Animales B6 CD45.2<sup>+</sup> control o infectados con *T. cruzi* al 13 dpi, fueron anestesiados y se les inyectó 10x10<sup>6</sup> timocitos aislados de animales B6 CD45.1<sup>+</sup>, en 20 µl de solución fisiológica, directamente en el timo. Luego de 48hs los animales fueron sacrificados, se extrajeron los timocitos y por citometría de flujo se evaluaron los timocitos CD45.1<sup>+</sup> marcando además: CD8, CD4, CD44 y Eomes. (A) Histogramas representativos de la expresión de CD44 en timocitos control CD45.1<sup>+</sup> (H) inyectados en un animal receptor control (R cont) o infectado (R *T. cruzi*). Se muestran los resultados de dos animales independientes (H1 y H2). (B) Gráfico de la MFI para CD44 de los timocitos CD45.1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> en ambos ambientes (control vs infectado con *T. cruzi*). (C) Gráfico de la expresión del factor de transcripción Eomes de los timocitos CD8<sup>+</sup> CD45.1<sup>+</sup> calculada como la diferencia entre la MFI de Eomes menos la MFI del control de isotipo (CI). (D) Histogramas representativos de la expresión de Eomes vs el CI de timocitos CD45.1<sup>+</sup> inyectados en un animal receptor control o infectado con *T. cruzi*. Los resultados se muestran como la media ± SEM. Los datos son el resultado de 3 repeticiones del mismo experimento con 3-5 animales por grupo. La prueba estadística aplicada fue la prueba t de Student. \*\* p<0,01 y \*\*\* p<0,001.

Moléculas involucradas en el desvío del linaje T convencional a innato durante la infección con *T. cruzi*

Nos planteamos si sería posible observar la conversión de células SP CD8 CD44<sup>lo</sup> al fenotipo CD44<sup>hi</sup> innato en un modelo *in vitro* de manera similar a lo que sucedía en los experimentos *in vivo* mostrados en la Figura 34. El objetivo es observar que sucede con el fenotipo de timocitos de animales controles B6 CD45.1<sup>+</sup> (SP CD8 CD44<sup>lo</sup> Eomes<sup>-</sup>, células blanco) cuando son co-cultivados con timocitos de animales B6 CD45.2<sup>+</sup> (células efectoras)

controles u obtenidos al día 14 post-infección con *T. cruzi*, no estimulados o estimulados con PMA más ionomicina por 2 hs previas al co-cultivo. Observamos, de manera similar a los experimentos *in vivo*, que los timocitos SP CD8 CD45.1<sup>+</sup> presentaban un incremento significativo en la expresión del marcador de activación CD44 y del factor de transcripción Eomes, cuando fueron co-cultivados por 48hs con timocitos de animales infectados, cuando eran estimulados con PMA más ionomicina, con respecto a las demás condiciones (Figura 35A y 35B respectivamente).

En la literatura está descripto que la generación de las células T CD8<sup>+</sup> innatas depende directamente de IL-4, la cual interviene en el incremento de la expresión de Eomes y por ende en la adquisición de las características propias de estas células<sup>[35, 38, 46, 48, 61, 63, 65, 66]</sup>. Por otro lado, también está descripto que la IL-15 es importante para el mantenimiento de las células innatas<sup>[40]</sup>. En base a estos hallazgos de la literatura y a nuestros resultados previos expuestos en el segundo capítulo de la tesis, decidimos evaluar si IL-4 e IL-15 estaban involucradas en el desvío de la diferenciación de timocitos convencionales a innatos dentro del timo luego de la infección con *T. cruzi*. Para ello realizamos cultivos *in vitro* de células provenientes de timo de animales WT B6 CD45.1<sup>+</sup> co-cultivadas con timocitos aislados de animales B6 CD45.2<sup>+</sup> infectados con *T. cruzi* y previamente estimulados con PMA más ionomicina en presencia de un anticuerpo bloqueante de IL-15 (anti-IL-15). En este caso observamos que se revierte el incremento en la expresión de CD44 cuando se bloquea la señal de IL-15, demostrando la importancia de dicha citoquina en la adquisición del fenotipo activado (Figura 35C). Más aún, cuando co-cultivamos timocitos control aislados de animales WT CD45.1<sup>+</sup> con timocitos aislados de animales IL-4KO CD45.2<sup>+</sup> infectados con *T. cruzi* y estimulados previamente con PMA más ionomicina, observamos que no se induce la expresión de CD44 (Figura 35D) ni la de Eomes (Figura 35D). Resultados similares se obtuvieron luego del bloqueo simultáneo de la señal por IL-4 e IL-15 (Figura 35C y 35D respectivamente).



**Figura 35:** Moléculas involucradas en el desvío del linaje T CD8<sup>+</sup> convencional a innato. Células aisladas de timos de animales B6 CD45.2<sup>+</sup> control o infectados con *T. cruzi* fueron cultivadas durante 2 hs a 37°C en presencia o ausencia de PMA + ionomicina. Luego se centrifugó la placa de cultivo y se descartó el sobrenadante. A cada uno de los pocillos se les adicionaron células aisladas de timo de animales control CD45.1<sup>+</sup>. Los co-cultivos fueron incubados por 48 hs a 37°C. Finalmente se realizó una citometría de flujo marcando con los Ac que reconocían las moléculas CD4, CD8, CD45.1, CD44 y Eomes. Los análisis se realizaron sobre la población SP CD8 CD45.1<sup>+</sup>. (A y B) Gráficos de la expresión de CD44 y Eomes en los timocitos SP CD8 CD45.1<sup>+</sup> co-cultivados con células de animales WT CD45.2<sup>+</sup> control o infectados con *T. cruzi*. (C y D) Expresión de CD44 y Eomes en los timocitos SP CD8 CD45.1<sup>+</sup> co-cultivados con timocitos aislados de animales WT CD45.2<sup>+</sup> control o infectados con *T. cruzi* o IL-4KO CD45.2<sup>+</sup> infectados con *T. cruzi*, estimulados con PMA más ionomicina en presencia o ausencia de 1000 ng/ml de Ac bloqueante de IL-15 (anti-IL-15). Los resultados se muestran como la media ± SEM. Los datos son el resultado de 3 repeticiones del mismo experimento con 3-4 animales por grupo. La prueba estadística aplicada fue un ANOVA de una vía.\* p<0,05, \*\* p<0,01 y \*\*\* p<0,001, ns = no significativo.

Considerando los resultados de este capítulo podemos decir que tanto la inducción en la expresión de CD44 como de Eomes, dos factores críticos en la diferenciación del linaje innato, están regulados por la presencia de IL-4 e IL-15, las cuales son producidas de



manera local en el timo como consecuencia del proceso infeccioso/inflamatorio sistémico tipo Th1.

### CONCLUSIONES CAPITULO IV

En este último capítulo evaluamos los mecanismos responsables de los cambios en la decisión de linaje de los timocitos CD8 convencionales hacia el linaje innato, en timo durante condiciones infecciosas/inflamatorias de tipo Th1. Pudimos definir lo siguiente:

- ✓ Durante la infección con *T. cruzi* se generan cambios en el timo que provocan que un gran porcentaje de timocitos residentes CD8<sup>+</sup> que al día 7 pi (momento de la tinción) eran CD44<sup>lo</sup> adquieran una mayor expresión de CD44 convirtiéndose en timocitos CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup>.
- ✓ El microambiente tímico que se genera durante procesos inflamatorios/infecciosos de tipo Th1 permite la desviación del linaje de timocitos SP CD8 convencionales a innatos, ya que los timocitos controles incrementan la expresión tanto de CD44 como del factor de transcripción Eomes cuando son inyectados en el timo de animales infectados con *T. cruzi*, posiblemente por la interacción entre ellos a través de moléculas CMH-Ib no clásicas como Qa2 y por las citoquinas presentes, como IL-4 e IL-15.
- ✓ Determinamos que IL-4 e IL-15 participan en el desvío de la diferenciación convencional hacia timocitos de linaje innato *in vitro*.

Considerando todos los resultados presentados en esta tesis, podemos decir que durante condiciones infecciosas/inflamatorias tipo Th1 con una elevada producción temprana de IL-12 más IL-18, se genera un cambio en el microambiente tímico conformado por la elevada expresión de moléculas CMH-I no clásicas y de las citoquinas IL-4 e IL-15 que favorecen el desvío en la diferenciación de timocitos SP CD8 convencionales hacia células CD8<sup>+</sup> innatas.

Esta desviación en la ontogenia SP CD8 del timo podría tener implicancia en el número y el repertorio de células T CD8<sup>+</sup> que son exportadas hacia los OLS durante situaciones pato-fisiológicas como procesos infecciosos/inflamatorios, lo cual podría condicionar el tipo de respuesta inmune frente a futuros desafíos.

# DISCUSIÓN

El timo es un órgano linfático primario muy importante a nivel del sistema inmune ya que es donde se generan, entre otras poblaciones celulares, las células T de la inmunidad adaptativa. En el timo se diferencian los linfocitos T desde su estadio más inmaduro DN hasta el estadio final SP. Los timocitos SP migran hacia OLS con un fenotipo virgen (CD44<sup>lo</sup>), capaz de adquirir un perfil de activación (CD44<sup>hi</sup>) a través de señales mediadas por su TCR durante distintas situaciones patológicas que alteren la homeostasis normal del organismo.

Desde hace varios años, distintos estudios sobre el timo demuestran que es un órgano capaz de censar cambios a nivel sistémico que pueden provocar alteraciones en la diferenciación de las células T, modificaciones en la expresión de moléculas del CMH sobre las CET y afectar los procesos de selección positiva y negativa de timocitos. Se ha descrito, por ejemplo, que sufre alteraciones frente a los estados fisiológicos de la pubertad y el embarazo, timomas, inflamación, infecciones bacterianas y virales, estrés, condiciones psicológicas, condiciones ambientales, terapia con corticosteroides, etc<sup>[6]</sup>. Es por esto que el estudio de todos aquellos factores que puedan provocar alteraciones en la ontogenia normal de células T en timo es de suma relevancia debido a la repercusión que puedan tener en la composición final del compartimiento de células T en OLS.

En este contexto, trabajos previos de nuestro grupo de investigación han reportado que los timocitos son capaces de responder a la expresión sistémica de las citoquinas IL-12 e IL-18 produciendo IFN $\gamma$ , lo cual es un hallazgo interesante considerando que el timo es un órgano con una limitada y selectiva entrada de macromoléculas como son las citoquinas<sup>[28]</sup>. Estudios *in vitro* realizados en nuestro grupo demostraron que IL-12 más IL-18 polarizan los timocitos hacia un perfil Th1 de una manera independiente de la señal del TCR, lo cual podría tener incidencia en la respuesta inmune en periferia, si se exportaran desde el timo células T con una vía de activación pre-establecida<sup>[28]</sup>. Trabajos posteriores de nuestro grupo se basaron en el estudio de los cambios que ocurren en el timo utilizando además de la expresión sistémica de IL-12 más IL-18 por inyección hidrodinámica<sup>[28, 29]</sup>, modelos patofisiológicos que cursan con una gran producción de estas citoquinas durante la etapa aguda de procesos inflamatorios como la infección con el parásito *T. cruzi* o el hongo *C. albicans* y el tratamiento con LPS bacteriano<sup>[26, 27]</sup>. En los mismos se demostró que durante condiciones infecciosas/inflamatorias de tipo Th1, el timo sufre atrofia y no se comporta como un órgano inmunoprivilegiado con una permeabilidad limitada, sino que se observa un incremento en el ingreso de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con fenotipo activado (CD44<sup>hi</sup>). Este ingreso está mediado por la producción local de la quemoquina MCP-1 que atrae a las

células T que expresan en su superficie el receptor para dicha quemoquina, CCR2<sup>[13]</sup>. A su vez se demostró que este efecto está mediado a través de la activación alternativa de las células T por las citoquinas IL-12 e IL-18 y no es dependiente de antígenos de los patógenos, es decir, no está mediada por la activación del TCR. Por lo tanto, se propuso un nuevo concepto de recirculación de linfocitos durante condiciones no-fisiológicas. En cualquier situación potencial donde haya una elevada producción de IL-12 e IL-18 como consecuencia de un proceso inflamatorio/infeccioso, la celularidad del timo disminuye favoreciendo la creación de nuevos nichos en este órgano que facilita la entrada de células T y B periféricas al timo. Este fenómeno ocurre en ausencia de cualquier estímulo antigénico y puede ser parte de una activación alternativa (bystander) de ciertas células B y T maduras periféricas<sup>[13]</sup>.

En función de estos resultados surgió la necesidad de ahondar en el estudio de los cambios que ocurren en el timo en estas circunstancias, parte de los cuales han sido abordados en esta tesis doctoral.

Como mencionamos previamente, el timo es esencial para la diferenciación de las células T. Inicialmente se creía que el timo era un sitio inmunoprivilegiado protegido de las infecciones y la respuesta inmune, además, se estimaba que sólo era importante durante la etapa temprana de la vida y dispensable después de la pubertad ya que se atrofia con la edad<sup>[16]</sup>. Sin embargo, estudios posteriores han revelado que el timo es tanto un órgano blanco de infección como también es un sitio a donde es reclutada la respuesta inmune<sup>[14-17, 20, 67]</sup>. Se ha demostrado que existen diversos patógenos capaces de infectar el timo pudiendo verse afectada la estructura tímica, su función, la selección de las células T y hasta su exportación hacia los OLS, lo cual podría repercutir en el desarrollo de futuras respuestas inmunes<sup>[16]</sup>. El efecto de la infección sobre el timo depende a su vez del tipo de patógeno, de la severidad de la infección y de la habilidad de infectar y persistir dentro del timo. La atrofia tímica temprana es una consecuencia común de diversas infecciones por virus, bacterias, parásitos y hongos<sup>[16, 20]</sup>. Por ejemplo, los glucocorticoides liberados durante la infección con *T. cruzi*, junto con la alta producción de TNF $\alpha$ , sinergizan para causar atrofia tímica<sup>[20]</sup>. Por otro lado, hay patógenos como *T. cruzi* que pueden alterar la estructura tímica induciendo cambios en la matriz extracelular<sup>[15]</sup>, o virus como el HIV que son capaces de infectar a las células epiteliales tímicas y llevar a su degeneración y apoptosis<sup>[68]</sup>. Estas alteraciones pueden provocar cambios en la exportación de células T hacia los OLS como es el caso de la infección con *T. cruzi* en la cual se observa un incremento en la liberación de timocitos inmaduros DP hacia los OLS<sup>[69]</sup>. Una pregunta muy importante planteada por

algunos autores es si la infección del timo puede llevar a la generación de tolerancia específica contra Ags del patógeno ya que, por ejemplo, se ha descrito que durante la infección con *M. avium*, en la cual el patógeno persiste en el timo, se generan células T anormales debido a que no responden adecuadamente a Ags de *M. avium* comparadas con células T que se desarrollaron en un timo no infectado<sup>[70]</sup>.

Otros reportes demuestran que en algunos procesos infecciosos se observa el ingreso de células T activadas específicas para los patógenos para contrarrestar la infección. Tal es el caso de la infección con *M. avium* y *M. tuberculosis* en donde se encuentran en timo células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> Ag-específicas, como parte de la respuesta inmune contra la bacteria persistente<sup>[17, 18]</sup>. Además ha sido reportado por nuestro grupo de investigación que durante condiciones infecciosas/inflamatorias tipo Th1 aumenta el reclutamiento de células T y B desde los OLS hacia el timo, como consecuencia del proceso inflamatorio<sup>[13]</sup>. En este trabajo de tesis demostramos que durante la infección de *T. cruzi* ocurre atrofia tímica y al igual que reportes previos<sup>[14, 15]</sup>, describimos que *T. cruzi* es capaz de infectar el timo, encontrándose dentro de Ma y células CD11b<sup>-</sup> con morfología de célula epitelial (Figura 15). También describimos que durante la infección con *T. cruzi* hay células SP CD8 activadas específicas del patógeno (Figura 16). Estas células podrían estar siendo reclutadas desde OLS para combatir la infección y eliminar el patógeno y poder restablecer el normal funcionamiento del timo. Aunque es necesaria la realización de experimentos que confirmen ésta hipótesis, se ha desmitificado el hecho de que el timo sea un órgano inmunoprivilegiado. Más aún, todos estos reportes dan idea de que el timo es un órgano dinámico que está altamente involucrado en el desarrollo de diversos procesos infecciosos, pudiendo ser un órgano blanco del patógeno.

Durante el desarrollo de las células T en timo ocurren dos procesos de selección, positiva y negativa, destinados a la generación de un grupo de células T que sean capaces de interaccionar con las moléculas de CMH propias a través de su TCR y que no reconozcan Ag propios (auto-reactivos) para evitar los fenómenos de autoinmunidad. Durante la selección positiva, una señal persistente a través del TCR induce la diferenciación de los timocitos DP hacia células T CD4<sup>+</sup> (timocito SP CD4), mientras que si la señal a través del TCR es corta el timocito DP se vuelve respondedor a citoquinas de tipo  $\gamma$ c (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 y IL-21), migra hacia la médula tímica y se diferencia a un timocito SP CD8<sup>[71]</sup>. Estas citoquinas tienen roles no redundantes en la diferenciación de los timocitos SP CD8. Se ha descrito que IL-4 activa las kinasas AKT y ERK involucradas en la señalización del TCR, las cuáles señalizan a través del factor de transcripción STAT-6. Además, IL-4

promueve la diferenciación de los timocitos CD8<sup>+</sup> ya que interacciona con un gen asociado a la decisión de linaje CD8 y genera células T CD8<sup>+</sup> con un fenotipo activado CD44<sup>hi</sup> y que expresan Eomes, un factor de transcripción de la familia T-box. Éste subtipo de células T CD8<sup>+</sup> recibió el nombre de células T CD8<sup>+</sup> “innatas”, las cuáles se generan en timo a partir de timocitos DP después de la selección positiva y de una manera dependiente de IL-4<sup>[35, 38, 46, 48, 63, 65, 66, 71]</sup>. En este trabajo de tesis, describimos que durante condiciones infecciosas/inflamatorias de tipo Th1 hay una gran producción de IL-4 dentro del timo y que ésta citoquina es capaz de interactuar con su receptor expresado en la superficie de células T CD8<sup>+</sup> generando en ellas el incremento en la expresión de CD44 y del factor de transcripción Eomes. Junto con IL-15 son capaces de influir en la diferenciación de los timocitos e inducir el desvío hacia células T innatas CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> Eomes<sup>+</sup> (Figuras 24 y 35).

Las células T CD8<sup>+</sup> innatas han sido previamente descritas en diversos modelos de animales transgénicos. Se identificaron inicialmente en animales que carecían de la expresión de distintas moléculas involucradas en la señalización a través del TCR como ITK, RLK, KLF2 entre otras<sup>[33, 34, 37, 39, 40, 42, 72]</sup>. Los autores demostraron que en timo de estos animales transgénicos se desarrolla una subpoblación de células que expresan el factor de transcripción PLZF y producen una elevada concentración de IL-4, entre las cuales se encontraban las células T  $\gamma\delta$ , NKT y T CD4<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup><sup>[35, 38, 63, 65]</sup>. Este gran incremento en la producción de IL-4 en timo provoca la aparición de un subtipo de células T CD8<sup>+</sup> que, a diferencia de una célula T convencional virgen, presenta un fenotipo activado/memoria con una rápida capacidad de producir IFN $\gamma$ <sup>[32, 34, 37, 42, 71-75]</sup>. A su vez, se caracterizan por una alta expresión del factor de transcripción Eomes y son diferentes a una célula de memoria convencional porque no expresan el factor de transcripción Tbet<sup>[34, 65, 76-79]</sup>. En su caracterización se describió que expresan en su superficie la molécula CD122 que es la cadena  $\beta$  del receptor de IL-15 y por lo tanto son altamente dependientes para su desarrollo y mantenimiento de IL-15<sup>[40]</sup>. En este trabajo de tesis demostramos, por primera vez, que también se generan células T CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> CD122<sup>+</sup> Eomes<sup>+</sup> innatas en el timo durante condiciones patofisiológicas como la infección con *T. cruzi* y *C. albicans* donde ocurre un proceso infeccioso/inflamatorio tipo Th1 agudo y no sólo cuando existen deficiencias genéticas ligadas a la vía de señalización del TCR (Figura 21). Además, demostramos que este fenómeno no es dependiente del patógeno sino que ocurre por el ambiente inflamatorio generado por la producción sistémica de IL-12 más IL-18 (Figura 21). Estos hallazgos aportan nuevos datos sobre la ontogenia de estas células y señalan que durante el desarrollo

de la respuesta inmune frente a una infección, se generan alteraciones a nivel del timo que generan un desvío en la diferenciación convencional de los timocitos SP CD8.

Diversos estudios se han focalizado en comprender cómo se generan las células T CD8<sup>+</sup> innatas en timo, aunque todavía es un tema muy controversial. Algunos autores describen que éstas se generan por la interacción de su TCR con una molécula del CMH-I no clásica expresada sobre la superficie de otra célula hematopoyética (otro timocito o CD) y no sobre las CECT<sup>[39, 40, 43-45]</sup>. Incluso reportan que la presencia de células hematopoyéticas MHCI<sup>+</sup> es suficiente para la selección de las células CD8 innatas en distintos modelos de ratones mutantes<sup>[33, 43, 80]</sup>. Sin embargo, en otros trabajos se describe que las células T CD8<sup>+</sup> innatas se generan en timo de animales WT principalmente por interacciones con células no-hematopoyéticas<sup>[37]</sup>.

La fuerza de la señal que recibe un timocito a través de su TCR en el proceso de selección positiva, puede determinar si va a adoptar un fenotipo convencional o innato. Esta hipótesis se apoya en la observación de que en animales transgénicos en los cuales está delecionado el gen de la kinasa I $\kappa$ k, que está involucrada en la vía de señalización a través del TCR, hay una expansión de los timocitos CD8<sup>+</sup> innatos<sup>[40]</sup>. Sin embargo, estas observaciones se contraponen con los reportes de que la generación de las células CD8<sup>+</sup> innatas depende de la señal de IL-4 producida por las células NKT, lo cual no involucra la señal del TCR<sup>[46, 48, 63, 65, 66]</sup>; en el mismo sentido otros trabajos afirman que la generación de las células T CD8<sup>+</sup> innatas está medida por la activación de las células por IFN tipo I, los cuales provocan la expresión de Eomes y por lo tanto regulan la función y homeostasis de estas células<sup>[77]</sup>. En particular, en nuestro modelo de investigación describimos que existe un incremento en la expresión de la molécula CMH-Ib no clásica, Qa2, a partir de lo cual podemos hipotetizar que la generación de las células innatas en timo, en estas circunstancias, esté siendo mediada por la interacción entre los timocitos a través del TCR y Qa2 (Figuras 18-20). Sin embargo, se necesitan más estudios para demostrar la interacción directa a través de esta molécula y su rol en el desarrollo de las células T CD8<sup>+</sup> innatas.

El subconjunto de células innatas incluye a las células T $\gamma\delta$ , NKT invariantes (iNKT) específicas para CD1d, células T invariantes asociadas a las mucosas (MAIT) específicas para MR-1, células T CD8<sup>+</sup> específicas para H2-M3, entre otras. Todas ellas dependen de IL-15 para su desarrollo y de la vía de señalización de la molécula de activación (SLAM) asociada a la proteína adaptadora (SAP) junto con la interacción de B7-CD28 para su maduración funcional. Este subtipo de células presentan un repertorio restringido de TCR<sup>[33, 34]</sup>. A diferencia de estas células innatas, las células T CD8<sup>+</sup> Eomes<sup>+</sup> innatas presentan una



amplia diversidad de TCR, una característica que las asemeja a las células T convencionales<sup>[36, 37, 43-45, 81-84]</sup>. Se ha descrito, que en un modelo de animales transgénicos que presentan un incremento en la población de células PLZF<sup>+</sup> productoras de IL-4 ocurre un aumento de la población CD8<sup>+</sup> Eomes<sup>+</sup> innatas (ratones CIITA transgénicos) que poseen distintos TCR en su superficie, sugiriendo que estas células pueden ser seleccionadas a través de la interacción con diversos péptidos presentados sobre moléculas del CMH-I no clásicas<sup>[36]</sup>. Demostramos en este trabajo de tesis que tanto *in vitro* en presencia de IL-4 e IL-15, como *in vivo* mediante inyección intratímica, timocitos con una amplia variedad de TCR CD8<sup>+</sup> CD44<sup>lo</sup> incrementan la expresión de CD44 y Eomes en condiciones infecciosas/inflamatorias tipo Th1 independientemente de Ag (Figuras 34 y 35).

Cuál es la función de las células T CD8<sup>+</sup> innatas es una pregunta que reviste gran importancia para entender porqué se generan en diversas respuestas inmunes. Las células CD8<sup>+</sup> innatas han sido descritas tanto en animales WT en condiciones normales<sup>[37]</sup> como en humanos<sup>[36, 41]</sup>. Se cree que estas células podrían ayudar en la primera línea de defensa en distintas infecciones por su capacidad de ejercer una función efectora inmediata, mientras se va generando la respuesta inmune adaptativa. Además pueden proveer citoquinas, quimiocinas y otros factores en la fase temprana de la respuesta inmune que podrían influenciar y/o ayudar al impulso de la respuesta inmune adaptativa. Un estudio de Kristin R. Renkema y col. muestra como en animales IL-4KO se ve afectada la respuesta contra el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) ocasionada por una disminución del número de las células CD8<sup>+</sup> innatas<sup>[47]</sup>. Existen reportes en modelos experimentales de cáncer en donde se ha descrito que las células T CD8<sup>+</sup> innatas son reclutadas por distintos tratamientos al ambiente tumoral y que provocan la muerte de las células tumorales a través de la interacción de NKG2D con su ligando sobre la célula tumoral, lo cual lleva a la activación de los mecanismos citotóxicos propios de un linfocito T CD8<sup>+</sup><sup>[53-55]</sup>. Además se cree que las células T CD8<sup>+</sup> innatas podrían ejercer un rol importante colaborando con la respuesta inmune adaptativa, ya que son capaces de producir altas concentraciones de IFN $\gamma$  cuando son activadas a través de los receptores de las citoquinas inflamatorias IL-12 e IL-18, liberadas por diversas células activadas de la inmunidad innata<sup>[49]</sup>. Ha sido descrito que las células T CD8<sup>+</sup> innatas presentan un rol protector en ciertas infecciones bacterianas<sup>[49, 64]</sup>, virales<sup>[81]</sup> y parasitarias<sup>[85]</sup> por ejemplo, se demostró que pueden reducir la carga bacteriana en pulmón y en hígado de ratones infectados con *Listeria monocytogenes* a través de la secreción temprana de IFN $\gamma$  durante la infección<sup>[49]</sup>, como así también son capaces de controlar la viremia inicial en un modelo animal de infección con el virus de la

coriomeningitis linfocítica (LCMV)<sup>[81]</sup>. De manera similar, demostramos en este trabajo de tesis, que las células T CD8<sup>+</sup> innatas generadas en timo en condiciones infecciosas/inflamatorias tipo Th1, liberan una gran cantidad de IFN $\gamma$ , tienen una alta expresión de NKG2D y una elevada actividad citolítica (evidenciada por un incremento en la expresión de CD107a) (Figuras 23 y 28). Más aún, estas células ejercen un rol protector en la infección con *T. cruzi* (Figuras 30-32).

La existencia de células TCD8<sup>+</sup> innatas en humanos está en estudio. Está descrito que se encuentran células T CD8<sup>+</sup> innatas en muestras de bazo humano fetal, sangre periférica y en sangre de cordón<sup>[36, 41]</sup>. Estas células expresan Eomes, producen IFN $\gamma$  en respuesta a una estimulación innata a través de IL-12 + IL-18 y presentan una actividad citotóxica potente independientemente del Ag (células T CD8<sup>+</sup> KIR/NKG2A<sup>+</sup> Eomes<sup>+</sup>)<sup>[36, 41]</sup>. Estas características se asemejan a las encontradas en modelos animales. Debido a que se encuentran en sangre de cordón, antes de la exposición con Ags en los OLS, se hipotetiza que derivan también de timo como lo propuesto en modelos murinos y se sugiere que pueden contribuir activamente en la respuesta inmune innata frente a varios patógenos en el período perinatal humano<sup>[36, 41]</sup>.

Las células T CD8<sup>+</sup> innatas son células con características de una célula de memoria pero que no necesitaron el contacto previo con el Ag específico, es decir, que rápidamente pueden activarse junto con la primera línea de defensa del sistema inmune. Es por esto que creemos importante el estudio de ellas, especialmente en humanos en donde podrían ser importantes durante los primeros años de vida cuando todavía no se ha desarrollado la inmunidad específica. Por otro lado, sería interesante también, el estudio del rol de las células T CD8<sup>+</sup> innatas en enfermedades humanas que cursan con una elevada producción sistémica de IL-4, como las enfermedades atópicas o aquellas con un fuerte contenido Th2 ocasionadas por algunos patógenos, y evaluar si estas células serían beneficiosas o no para el individuo.

Por otro lado, futuros experimentos de nuestro grupo estarán orientados a estudiar si los cambios generados en el timo bajo estas circunstancias infecciosas/inflamatorias se revierten con el tiempo y que ocurre con la ontogenia T. Esto es importante, ya que como mencionamos anteriormente, el timo tiene un rol activo durante procesos infecciosos y es un OLP en el cual se generan las células T, importantes efectoras de la inmunidad adaptativa.

# **CONCLUSIÓN**

## **GENERAL**

En conclusión, a lo largo de este trabajo de tesis estudiamos los cambios que ocurren en el timo, órgano linfático primario, durante condiciones infecciosas/inflamatorias de tipo Th1. Más específicamente estudiamos el desarrollo del linaje de células T CD8<sup>+</sup> innatas, a través de distintas metodologías experimentales *in vitro* e *in vivo* con modelos animales de infección e inflamación sistémica como la infección con *T. cruzi* o *C. albicans* o la expresión sistémica mediante inyección hidrodinámica de IL-12 más IL-18.

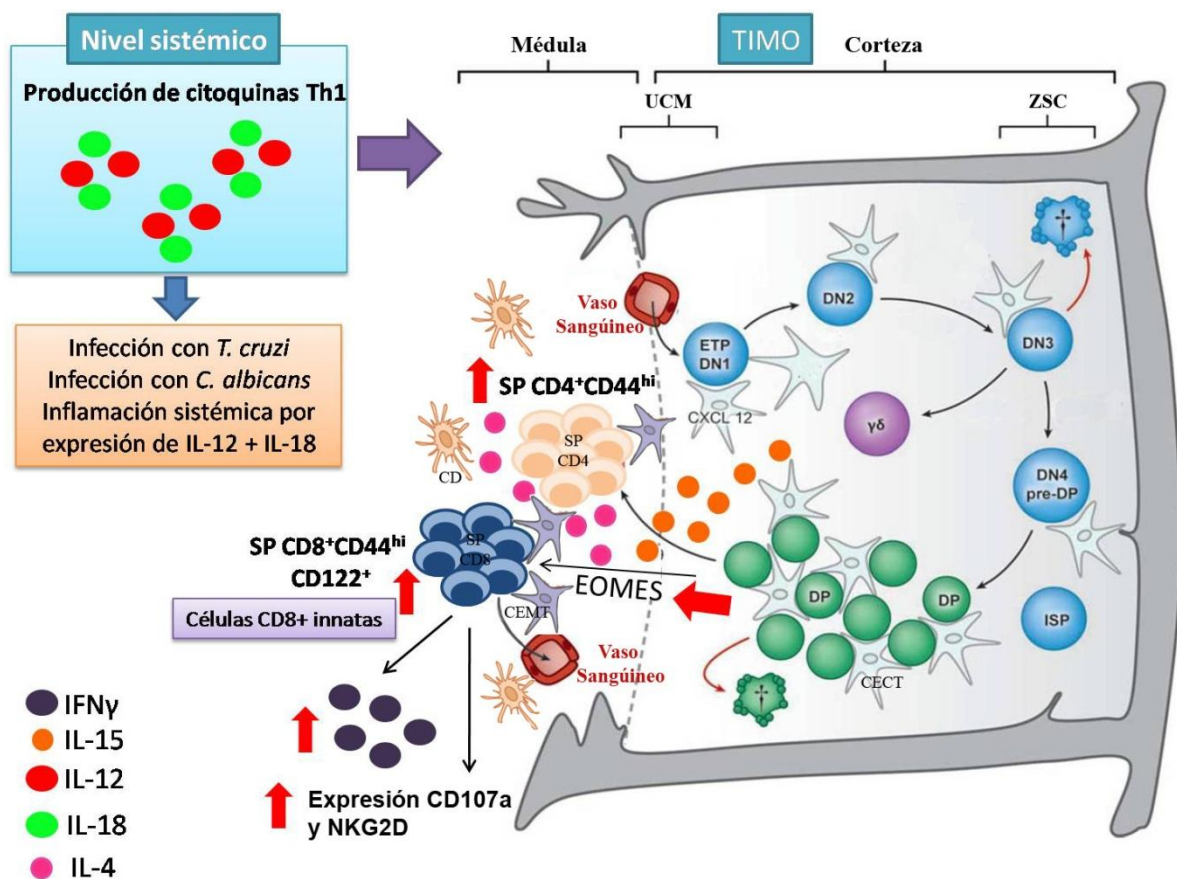
Nuestros hallazgos son sumamente relevantes respecto a la información que han provisto otros trabajos sobre los mecanismos involucrados en la ontogenia de células T CD8<sup>+</sup> innatas pero que se han basado exclusivamente en modelos no fisiológicos con animales modificados genéticamente, deficientes en ciertas moléculas<sup>[33, 38]</sup>. En este contexto es importante mencionar que nuestros resultados presentan las primeras evidencias no reportadas aún en la literatura de que animales WT que atraviesan situaciones patofisiológicas como procesos infecciosos/inflamatorios agudos con fuerte componente Th1, presentan en timo un desvío del linaje T CD8<sup>+</sup> convencional hacia el linaje innato.

Demostremos que durante condiciones infecciosas/inflamatorias de tipo Th1 con una elevada producción de IL-12 más IL-18, el timo sufre diferentes cambios como modificaciones estructurales, cambios en las citoquinas producidas en el microambiente y un incremento en la expresión de moléculas del CMH-I no clásicas como Qa2. Además observamos un incremento en la producción local de IL-4 e IL-15 que generan un ambiente condicionado que favorece el desvío de la diferenciación de timocitos convencionales hacia células CD8<sup>+</sup> innatas, evidenciado como un incremento en el número de células CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>EOMES<sup>+</sup> en timo. Estas células innatas tienen la capacidad de producir rápidamente IFN $\gamma$ , poseen una gran capacidad citotóxica (expresan NKG2D y CD107a) y al ser transferidas adoptivamente generan un incremento significativo en la supervivencia de animales infectados con *T. cruzi*. Finalmente podemos decir que las células T CD8<sup>+</sup> innatas en estas condiciones se generan *in situ* en el timo y no provienen del ingreso de células maduras desde los OLS.

La presencia de células T CD8<sup>+</sup> no convencionales sugiere una desviación en la ontogenia normal del timo que puede tener implicancia en el número y el repertorio de células T que son exportadas hacia los OLS.

Con los resultados expuestos en esta tesis reforzamos la importancia del estudio del timo en diferentes condiciones ya que es un OLP que sufre diversas alteraciones cuando las células presentes en este censan cambios en el microambiente como citoquinas, quimiocinas y otros factores químicos llevando a una expresión diferencial de moléculas en la superficie

de los timocitos y células epiteliales, afectando así los procesos de selección y diferenciación tímica. Todas estas modificaciones podrían converger, como lo demostrado en esta tesis, en un desvío en la diferenciación convencional de los timocitos hacia el linaje innato. A su vez estos cambios podrían afectar el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa frente a diversos patógenos o procesos autoinmunes en OLS.



**Figura 37:** Desarrollo de células T CD8<sup>+</sup> innatas en timo bajo condiciones infecciosas/inflamatorias de tipo Th1. Diagrama representativo de los resultados expuestos en este trabajo de tesis. En el timo hay una gran producción de IL-15 e IL-4 (liberada por los timocitos SP CD4) que inducen a los timocitos SP CD8 a que se diferencien a células T CD8<sup>+</sup> innatas incrementando el factor de transcripción Eomes. Las células T CD8<sup>+</sup> innatas expresan CD107a y NKG2D en su superficie y producen grandes cantidades de IFN $\gamma$ . La figura del timo fue adaptada del trabajo de *María Ciofani y col. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2007*. Siglas: UNC (unión cortico-medular), ZSC (zona subcapsular), CEMT (célula epitelial medular tímica), CECT (célula epitelial cortical tímica), CD (células dendrítica), DN (doble negativo), DP (doble positivo), SP (simple positivo).

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## ANIMALES

Para la realización de los distintos experimentos, se utilizaron animales C57BL/6 CD45.2 y CD45.1 endocriados en el Bioterio del CIBICI-CONICET (Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, CONICET). Los ratones OT-I (C57BL/6-Tg (TcraTcrb) 1100Mjb/J) fueron provistos por The Jackson Laboratory (Bar Harbor, EE.UU). En éstos el receptor de las células T reconoce los residuos 257-264 de Ovalbúmina (OVA) en el contexto de H2Kb. Para los experimentos de esta tesis fueron seleccionados aquellos animales OT-I que presentaban entre un 80-95% de células T con la cadena V $\beta$ 5 del TCR. Los animales CD8 $\alpha$  KO (B6.129S2-Cd8<sup>atm1Mak</sup>/J) fueron adquiridos en los laboratorios Jackson y presentan la mutación Cd8<sup>atm1Mak</sup> por lo cual son deficientes en células T CD8<sup>+</sup>, pero el desarrollo y función de las células T cooperadoras CD4<sup>+</sup> es comparable a los normales.

Todos los animales se mantuvieron a 22°C bajo ciclos de luz/oscuridad (comenzando a las 7am), acceso continuo a alimento balanceado comercial y agua potable estéril.

Fueron mantenidos en el Bioterio del CIBICI-CONICET de acuerdo con los requisitos del comité ético para animales de experimentación de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Resolución del Honorable Consejo Directivo 480/05). El cuidado de los animales fue llevado a cabo según los procedimientos descritos en la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" (NIH National Institutes of Health – EEUU. Publicación N° 86-23, 1985).

Los protocolos experimentales utilizados en esta tesis, también fueron aprobados por el Comité Institucional de uso y cuidado animal (IACUC) (Resolución HCD 249/16). El NIH aprobó la seguridad del bienestar de los animales mantenidos en el bioterio del CIBICI-CONICET (número de certificación A5802-01, OLAW, NIH, EE.UU).

## REACTIVOS QUÍMICOS

Se utilizó medio de cultivo RPMI 1640 y L-glutamina (Glutamax) marca Gibco (Life Technologies, Reino Unido). El suero fetal bovino fue provisto por la empresa Argentina NATOCOR y la solución fisiológica es de marca Roux-Ocefa S.A.

El *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE), el agua *DNA ultrapure* y el TRIZol fueron adquiridos en Molecular Probes, Invitrogen (EE.UU).

El *buffer* para lisar glóbulos rojos (Tris-cloruro de amonio), el azul de tripán, la albúmina sérica bovina, el acetato de forbol miristrato (PMA) y la ionomicina se compraron en Sigma-Aldrich Chemical Co (EEUU).

La gentamicina utilizada fue de marca Schering-Plough, mientras que la heparina libre de aditivos de 5.000 U/mL fue de marca Fada Pharma (Argentina). La brefeldina y la monensina empleadas se compraron en eBiosciences (EEUU). Los *buffers* CytoFix/CytoPerm, Perm/Wash y FOXP3 Staining Buffer Set fueron adquiridos en la empresa BD Biosciences (EEUU).

El ácido sulfúrico, el 2-propanol, el etanol, el cloroformo y el metanol utilizados, fueron de las marcas Cicarelli (Argentina), Sintorgan (Argentina), Dorwill (Argentina) y Taurus (Argentina), respectivamente.

Otros reactivos como fosfato de sodio, cloruro de sodio, carbonato de sodio, fueron de marca Anedra (Nueva Zelanda), el carbonato de potasio fue de marca Cicarelli (Argentina), la sacarosa y el cloruro de amonio fueron de marca Taurus (Argentina). El agar Sabouraud glucosado y el extracto de levadura fueron de marca Britania (Argentina).

Los reactivos de biología molecular utilizados en la RT-PCR fueron de marca Promega (EEUU), mientras que los utilizados para la PCR en tiempo real se adquirieron en la empresa Applied Biosystem (EEUU).

## **MODELOS DE INDUCCIÓN DE INFLAMACIÓN SISTEMICA DE TIPO TH1**

### INYECCIÓN HIDRODINÁMICA DE IL-12 E IL-18 EN ADNc

La inflamación sistémica se indujo utilizando un protocolo de transfección génica transitoria por inyección hidrodinámica endovenosa de vectores de expresión (ADNc desnudo) que codifican para las citoquinas IL-12 e IL-18 reportado previamente por Rodríguez-Galán y col <sup>[13, 28, 29]</sup> a ratones C57BL/6 WT de 8 a 12 semanas de edad.

La transferencia génica mediante inyección hidrodinámica se realizó inyectando los plásmidos de expresión en la vena de la cola del animal en 1,6 ml de solución de cloruro de sodio 0,9% estéril y apirógena en 8 segundos. El proceso hidrodinámico aumenta la presión en tejidos y provoca la formación transitoria de poros que promueven el ingreso del ADN a los hepatocitos <sup>[86]</sup>.

Se trabajó con dos grupos experimentales: grupo control, inyectado con 11 µg del ADNc del vector control ORF vacío ó grupo IL-12+IL-18 tratado con 1 µg de ADNc de IL-



12 (este plásmido es una fusión de las secuencias que codifican para la subunidad p40 y p35, permitiendo la producción de IL-12 con actividad biológica, conocida como subunidad IL-12 p70) más 10 µg de ADNc de IL-18 (pDEF pro-IL-18). Los timos y bazos son colectados 7 días post inyección para su estudio. Como control de eficacia del tratamiento, se evaluó a través de los niveles séricos de IL-12 por la técnica de ELISA o a través de la marcada esplenomegalia manifiesta en el día de estudio.

### INFECCIÓN CON *TRYPANOSOMA CRUZI*

Ratones C57BL/6 WT y OT-I de 8 a 12 semanas de edad fueron infectados mediante una inyección i.p con  $5 \times 10^5$  trypomastigotes de *T. cruzi* diluido en 200 µl de PBS y luego sacrificados a los 14 días post infección en el día del pico de parasitemia. Los tripomastigotes de *Trypanosoma Cruzi* para la infección fueron mantenidos por pases consecutivos en ratones B6<sup>[57]</sup>.

### INFECCIÓN CON *CANDIDA ALBICANS*

Células de levaduras de *Candida albicans* fueron crecidas en placas con agar Sabouraud glucosa a 28°C y mantenidas por repiques semanales. Ratones adultos B6 de 8 a 12 semanas de edad fueron infectados por inyección i.p con  $3 \times 10^7$  unidades de *Candida albicans* viables diluidas en 200 µl de PBS y luego sacrificados 5 días post infección.

## **TÉCNICAS GENERALES**

### **PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS LIBRES DE ENDOTOXINA**

Las bacterias transformadas con los plásmidos con las secuencias incorporadas fueron expandidas en medio Luria Bertani (LB) con antibiótico ampicilina. Para purificar el ADNc se utilizó el kit comercial Endofree Plasmid Maxi Kit (Quiagen, Limburgo, Países Bajos) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Tal como indica su nombre, este kit permite obtener plásmidos libres de endotoxina permitiendo que el efecto observado in vivo sea a causa de la secuencia incorporada y no por una posible contaminación con LPS. El procedimiento de purificación fue monitoreado por alícuotas tomadas de lavados y fracciones de elución. El ácido nucleico fue precipitado con isopropanol y la calidad del

producto obtenido fue controlada mediante electroforesis en gel de agarosa. Por último, la concentración de ADNc fue medida por espectrofotometría en Bio-tek Synergy<sup>TM</sup>HT Multi-Detection (BioTek Instruments, EEUU).

## **CITOMETRIA DE FLUJO**

### **CITOMETRIA DE FLUJO DE SUPERFICIE**

Para el estudio de la expresión de marcadores de superficie y estadios de maduración de los timocitos y células T, se utilizaron anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44, anti-QA2, anti-CD24, anti-NK1.1, anti-CD122, anti-RIL-4 todos de BD-Pharmingen. En todos los casos la suspensión de células obtenidas de muestras de Bazo o Timo fue incubada por 30 minutos a 4°C con una mezcla de los diferentes anticuerpos en buffer para citometría (FACS Flow Buffer). Posteriormente las células fueron lavadas, centrifugadas por 5 minutos a 1800rpm y resuspendidas en buffer FACS. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FacsCanto II BD y los análisis se realizaron utilizando el programa FlowJo (Tree Star, Inc.). Todos los anticuerpos se detallan en la tabla 2.

### **CITOMETRIA DE FLUJO INTRACELULAR**

Para la tinción de citoquinas, las células fueron estimuladas con PMA (50ng/ml) e Ionomicina (1 µg/ml) durante 4 horas en placas de cultivo de 96 reservorios colocando en cada reservorio  $1 \times 10^6$  células en 200 µl finales de RPMI completo (10 % SFB, 1/100 Glutamina, 1/1000 Gentamicina). En las últimas 3 horas se añadió 5µg/ml de Brefeldina A. Luego las células se fijaron y permeabilizaron con el buffer Cytotfix/Cytoperm (catálogo 554722, BD Biosciences) y se tiñeron con anti-IFN $\gamma$ -FITC (Clon XMG1.2) de BD Biosciences. Luego de la incubación las células fueron lavadas y resuspendidas en buffer FACS. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro Facs Canto II BD y los análisis se realizaron utilizando el programa FlowJo (Tree Star, Inc.).

CITOMETRIA DE FLUJO INTRANUCLEAR

Para la citometría de flujo intranuclear se utilizaron los reactivos del set de marcación intranuclear de FOXP3 de eBiosciences (eBioscience Cat. No. 00-5523). En primer lugar se realizó la marcación de superficie de las células con anticuerpos monoclonales anti-CD4, CD8, CD44, NK1.1. Luego las células fueron fijadas y permeabilizadas siguiendo el protocolo de citometría de flujo intranuclear de eBiosciences y posteriormente incubadas por 20 minutos de 4°C con un anticuerpo monoclonal anti-Eomesodermina (EOMES)-PE o un anti-Tbet-PE. Luego de la incubación las células fueron lavadas y resuspendidas en buffer FACS. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro Facs Canto II BD y los análisis se realizaron utilizando el programa FlowJo (Tree Star, Inc.).

SEPARACIÓN CELULAR (CELL SORTING)

Para el estudio de las diferentes poblaciones celulares presentes en Timo y en Bazo las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE, anti-CD44-PECy5, anti-CD19-PECy7, anti-NK1.1-APC por 30 minutos a 4°C en PBS suplementado al 10% con suero fetal bovino en esterilidad. Luego de la incubación fueron lavadas y resuspendidas en PBS suplementado al 10% y purificadas por cell sorter en un Citómetro de Flujo Beckton Dickinson FACSAria II.

**Tabla 2:** Listado de anticuerpos utilizados para los diferentes ensayo de citometría de flujo

Anticuerpo	Marca	Especificidad	Isotipo	n° Catalogo y empresa
<b>CD4</b>	Biotina	Ratón	Rat IgG2b, k	553728 (BD)
	FITC	Ratón	Rat IgG2b, k	553729 (BD)
	PE	Ratón	Rat IgG2a, k	553049 (BD)
	APC-Cy7	Ratón	Rat IgG2b, k	552051 (BD)
<b>CD8</b>	APC	Ratón	Rat IgG2b, k	22150086 (LIGATIS)
	APC	Ratón	Rat IgG2a, k	553035 (BD)
	PE	Ratón	Rat IgG2a, k	553033 (BD)
	FITC	Ratón	Rat IgG2a, k	553031 (BD)

<b>CD44</b>	PE-Cy5	Ratón	Rat IgG2b, k	553135 (BD)
<b>NK1.1</b>	PE-Cy7	Ratón	Mouse IgG2a, κ	552878 (BD)
	APC	Ratón	Mouse IgG2a, κ	550627 (BD)
<b>CD24</b>	FITC	Ratón	Rat IgG2b, κ	561777 (BD)
<b>Qa2</b>	Biotina	Ratón	Mouse IgG2a,κ	558973 (BD)
<b>CD122</b>	Biotina	Ratón	Rat IgG2b, k	559884 (BD)
<b>CD45.1</b>	APC-Cy7	Ratón	Mouse IgG2a,k	560579 (BD)
<b>CD45.2</b>	PCP- Cy5.5	Ratón	Mouse IgG2a,k	552950 (BD)
<b>CD62-L</b>	PE-Cy5	Ratón		
<b>CD69</b>	PE-Cy7	Ratón	Hamster IgG1, I3	552879 (BD)
<b>EOMES</b>	PE	Ratón	Rata IgG2a, k	12-4875-82 eBios
<b>TBET</b>	PE	Ratón/Hum		SC71249
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	FITC	Ratón	Rat IgG1 , k	554411 (BD)
<b>Streptavidina</b>	PE-Cy7			405206 Biolegend
<b>Vb 5.1,5.2</b>	PE	Ratón	Mouse IgG1, κ	553190 (BD)
<b>TCR<math>\alpha\beta</math></b>	APC	Ratón		
<b>TCR<math>\gamma\delta</math></b>	FITC	Ratón	Hamster IgG2, k	553177 (BD)
<b>CD25</b>	PE	Ratón	Rat IgG2b, k	553075 (BD)
<b>CD107 (LAMP-1)</b>	PE	Ratón	Rat IgG2a, k	130-102-219 MACS Miltenyi Biotec
<b>Control de Isotipo</b>	FITC	Ratón	Rata IgG2b, k	553988 (BD)
	PE	Ratón	Rata IgG2b, k	556925 (BD)
	PE	Ratón	Rata IgG2a	12-4321-81 eBios

#### ENSAYO DE CITOTOXICIDAD (determinación de la expresión de CD107a)

Es un ensayo que se utiliza para evaluar la funcionalidad de los linfocitos citotóxicos. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> además de liberar citoquinas inflamatorias, liberan gránulos que

contienen perforinas y granzimas que provocan la lisis de las células blanco. Cuando una célula CD8 degranula, expresa en la superficie la molécula CD107a que es una glicoproteína transmembrana que reside en la membrana lisosomal/endosomal y puede expresarse de forma transitoria (ya que se internaliza rápidamente por la vía endocítica) en la superficie de estas células.

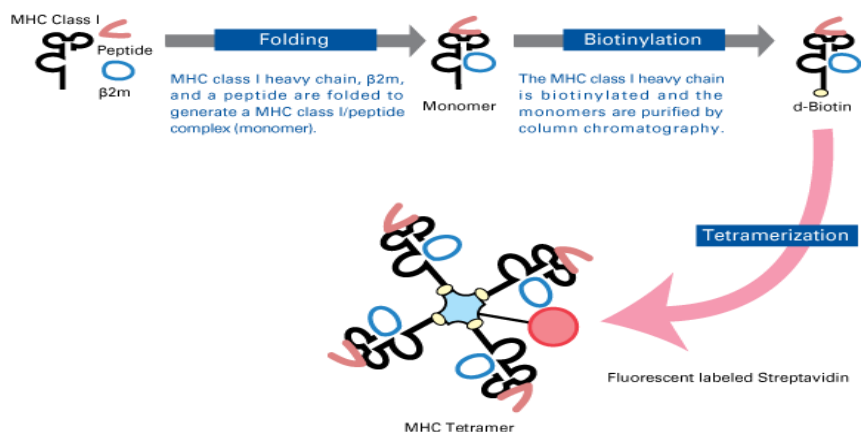
Para determinar la movilización de CD107a a superficie en respuesta a un estímulo se realizaron cultivos de forma similar a la determinación de citoquinas intracelulares pero en presencia del anticuerpo anti-CD107a conjugado a un fluorocromo incorporado desde el inicio del cultivo. Se utilizó monensina para impedir la acidificación de lisosomas y prevenir la desnaturalización del anticuerpo que pueda haberse internalizado como consecuencia de la endocitosis del CD107a.

En este cultivo las células deben estimularse con PMA 50 ng/mL más Ionomicina 1 µg/mL durante 5hs en total en presencia del anticuerpo anti-CD107a y luego de una hora y media a dos de cultivo se debe agregar monensina. Tal cultivo es usualmente realizado en placas de 96 pocillos fondo en U, utilizando 1-2 millones de células por pocillo en un volumen final de 200 µL (en RPMI completo).

Luego de transcurridas las horas de cultivo se realiza una tinción de citometría de superficie como la descrita en el apartado correspondiente, utilizando en este caso en particular anticuerpos marcados con un fluorocromo que reconozcan las moléculas CD4, CD8, CD44 y NK1.1. Se colocan las muestras en los tubos adecuados para poder pasarlos en el citómetro de flujo Facs Canto II BD.

#### DETERMINACIÓN DE CÉLULAS T ESPECÍFICAS PARA *T. CRUZI*

Para la determinación de células T con un TCR específico para un antígeno del *T. cruzi* se realizaron ensayos de citometría de flujo de superficie siguiendo los pasos anteriormente descritos, pero en este caso agregando junto con los anticuerpos anti-CD8, anti-CD4, anti CD44 y anti-NK1.1, un tetrámero de H-2k (CMH-I de la cepa C57BL/6) conjugado con el péptido TSKB20 y el fluorocromo APC (NIH Tetramer Core Facility). El péptido TSKB20 representa el antígeno más inmunogénico del parásito. Luego de la incubación las células fueron lavadas y resuspendidas en buffer de citometría. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro Facs Canto II BD y los análisis se realizaron utilizando el programa FlowJo (Tree Star, Inc.).



<http://www.mblintl.com/tetramer/classITetramers.aspx>

**Figura 36:** Diagrama de la generación de los tetrámeros. Se purifican las proteínas de las cadenas MCH-I,

## CULTIVO CELULAR

### ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR CON CFSE

Para evaluar la proliferación celular de células T  $CD8^+$  se realizaron ensayos para determinar la dilución de CFSE por citometría de flujo. Para ello, ratones B6 WT u OT-I infectados con *T. cruzi* fueron sacrificados a los 14 dpi o 13 dpi respectivamente, en el pico de parasitemia. Se extrajeron los timos y se disgregaron en PBS suplementado con 5% de SFB. Se tomó una alícuota de la suspensión celular y se contaron las células en cámara de Neubauer con el colorante Azul de Tripán en una dilución  $\frac{1}{2}$ . Se incubaron las células con CFSE  $4\mu M$  en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad y luego se realizaron 2 lavados con 10 ml de PBS +10% SFB cada uno, centrifugando las células a 1800 rpm por 5 minutos. Las células se resuspendieron en medio de cultivo RPMI completo. Finalizada la tinción se colocaron las células en placas de cultivo en presencia de las distintas citoquinas cuya concentración fue: 150 ng/ml de rIL-15, 20 ng/ml de rIL-4 o 10 ng/ml de rIL-12 más 50 ng/ml de rIL-18. Las placas se dejaron en una estufa de cultivo a una atmósfera constante de 5% de  $CO_2$  y 37 °C. Luego de 72hs se extrajeron las células de la placa y se colocaron en tubos adecuados para citometría de flujo y se incubaron las células con los siguientes anticuerpos: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44 y anti-NK1.1 diluidos en buffer de citometría, durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Finalmente las células se lavaron, se diluyeron en buffer de citometría y se adquirieron en el citómetro de flujo.

## CO-CULTIVO DE CELULAS CD45.1 WT CON CELULAS CD45.2 CONTROL O INFECTADAS

En primer lugar se extrajeron los timos de animales CD45.2<sup>+</sup>: B6 control, B6 infectados con *T. cruzi* o IL-4KO infectados con *T. cruzi*, se disgregaron y resuspendieron en PBS + 5%SFB. Se contaron mediante la coloración con Azul de Tripán en cámara de Neubauer. Las células fueron estimuladas con PMA (50 ng/ml) e Ionomicina (1 µg/ml) durante 2 horas en placas de cultivo de 24 reservorios colocando en cada reservorio 1 x 10<sup>6</sup> células en 1 ml final de RPMI completo (10%SFB, 1/100 Glutamina, 1/1000 Gentamicina). En los reservorios que correspondía se agregó, junto a los estímulos, el Ac neutralizante anti-IL15 (100 µg/ml). Luego de las horas de estimulación la placa fue centrifugada a 1800 rpm por 5 minutos para descartar el medio de cultivo que contiene los estímulos y se resuspendieron nuevamente las células en 500 µl de medio completo nuevo.

En segundo lugar se extrajo el timo de un animal B6 CD45.1<sup>+</sup> control, se disgregó el tejido y se resuspendieron las células en PBS + 5%SFB. Se contaron las células con Azul de tripán y se resuspendieron en medio RPMI completo en una concentración de 1 x 10<sup>6</sup> células en 500 µl.

Por último, se co-cultivaron 1,2 x 10<sup>6</sup> células CD45.1<sup>+</sup> en cada uno de los pocillos con 1,2 x 10<sup>6</sup> células CD45.2<sup>+</sup> en cada una de las condiciones (sin estímulo o estimuladas con PMA mas ionomicina o estimuladas con PMA mas ionomicina mas anti-IL-15). Cuando correspondía se agregó junto a las células el Ac anti-IL15 (100 µg/ml). El co-cultivo se mantuvo en estufa a 37 °C y una atmósfera constante de 5% de CO<sub>2</sub> durante 48hs.

Una vez finalizado el co-cultivo las células se extrajeron de la placa y se colocaron en tubos adecuados para citometría de flujo y se incubaron con los siguientes anticuerpos: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44 y anti-CD45.1 diluidos en buffer de citometría, durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Luego se realizó una citometría de flujo intranuclear utilizando un kit comercial para fijar y permeabilizar las células (que fue mencionado en la sección correspondiente para este procedimiento) e incubando con un Ac anti-EOMES o su control de isotipo. Finalmente las células se lavaron, se diluyeron en buffer de citometría y se adquirieron en el citómetro de flujo.

## MICROSCOPIAS

### PREPARACIÓN DEL TEJIDO PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

Luego de 14 días de la infección con *T. cruzi*, los ratones fueron sacrificados. Los timos fueron extraídos y sumergidos en paraformaldehído al 4% a 4 °C durante toda la noche para fijarlos. Luego fueron sumergidos en una solución de sucrosa al 30% a 4°C (Sigma-Aldrich) y mantenidos hasta su procesamiento. Los cortes de timo fueron realizados en el criostato Shandon Cryotomo E (Thermo Fisher Scientific). Para realizar los cortes se utilizó OCT (Sakura, Holanda) y éstos se montaron en portaobjetos silanizados (StarFrost®, Alemania), los cuales se secaron a temperatura ambiente por 1 h y luego se almacenaron a -20°C.

### INMUNOFLUORESCENCIA

Crio secciones de 10 µm de timo se equilibraron a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS y se bloquearon con buffer de bloqueo (10% albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich), 0.3% Tritón en PBS) por 1h en cámara húmeda. Los cortes fueron incubados con los Acs primarios correspondientes durante 1h 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego, las muestras se lavaron 3 veces con PBS y posteriormente, fueron incubadas con los Acs secundarios marcados con fluorocromo por 1 h a temperatura ambiente. Por último, los preparados se lavaron y los núcleos celulares fueron teñidos con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Finalmente, los vidrios fueron montados en FluorSave™ (Calbiochem®-Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Las imágenes de los distintos estudios histológicos realizados se capturaron usando un microscopio confocal laser-scanning (Olympus FV300, Tokyo, Japón).

### INMUNOFLUORESCENCIA EN CORTES HISTOLÓGICOS EN EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA ADOPTIVA

Animales B6 fueron infectados con *T. cruzi* y las suspensiones celulares de bazo fueron obtenidas a los 14 días post infección. Las suspensiones de esplenocitos fueron teñidas con el colorante eFluor 670 y 4-8 x10<sup>6</sup> células se transfirieron adoptivamente (TA) a otro grupo de ratones B6 infectados también con *T. cruzi* en el día 14 post infección.



Veinticuatro horas post TA se sacrificaron los animales y se extrajeron los timos, los cuales se fijaron con para formaldehído al 4% y luego se congelaron en OCT. Luego se realizaron cortes histológicos de 10  $\mu\text{m}$  utilizando un criostato. Para la inmunofluorescencia se lavaron los cortes histológicos con PBS para eliminar los restos de OCT y luego se bloquearon y permeabilizaron, por 1h a temperatura ambiente, con una solución de 10% BSA más 0,3% de tritón en PBS. Subsecuentemente se incubaron las muestras con el anticuerpo primario anti-CK5, que reconoce la citoqueratina 5 expresada por las células epiteliales de la médula tímica (mTEC), diluido en buffer de bloqueo, por 1hs 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Después de realizar 2 lavados con PBS se colocó el anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado a Alexa fluor 488 por 1 hora a temperatura ambiente seguido por DAPI (300 ng/ml) para marcar los núcleos celulares. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal Olympus-Fluoview 1000 espectral.

#### INMUNOFLUORESCENCIA PARA PARASITOS DE *T. CRUZI*

Ratones B6 fueron infectados con *T. cruzi* y la suspensión de células del timo se obtuvieron 14 días post infección. Las células fueron cultivadas por 72hs en vidrios colocados dentro de placas de Petri de 24 pocillos suplementadas con medio completo (RPMI suplementado con 10% suero fetal bovino más gentamicina y glutamina). Las células adherentes fueron obtenidas luego del lavado de los vidrios y fueron incubadas con un antisuero de un paciente chagásico y con un anticuerpo monoclonal que reconoce el antígeno CD11b. Subsecuentemente con un anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado con FITC y un anti-IgG de rata conjugado con Alexa fluor 546. Los parásitos se observaran de color verde y las células CD11b positivas de color rojo. Finalmente se tiñen las células con DAPI (300ng/ml) para distinguir los núcleos celulares.

#### ELISA

#### OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE PLASMA PARA LA MEDICIÓN DE CITOQUINAS

Para determinar los niveles plasmáticos de IL-12, se extrajeron aproximadamente 0,2 ml de sangre en tubos cónicos con 4  $\mu\text{l}$  de anticoagulante Heparina sódica 5000UI/ml (FADA PHARMA, Argentina) a distintos días post inyección. Las muestras fueron

centrifugadas (4 °C, 10 min a 2000 rpm) y el plasma fue separado en tubos cónicos de 0,5 ml y almacenado a -80 °C hasta su análisis por ELISA.

### OBTENCIÓN DE SOBRENADANTES DE CULTIVO PARA LA MEDICIÓN DE CITOQUINAS

Los sobrenadantes de los diferentes cultivos estudiados se extrajeron luego de centrifugar la placa de cultivo por 5 minutos a 1800 rpm, se colocaron en tubos cónicos de 0,5 ml y se guardaron a -80°C hasta el momento del análisis.

### ELISA

Para la detección de citoquinas como TNF $\alpha$ , IL-12 (BioLegend, San Diego, CA, EEUU) e IFN $\gamma$  (BD) en muestras de plasma o sobrenadantes de cultivos, según corresponda, se utilizaron kits de ELISA comerciales de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

En primer lugar, se sensibilizaron placas de 96 pocillos con el Ac de captura específico para cada citoquina diluido en buffer de sensibilización (buffer carbonato pH 9,6, fosfato pH 7,2 o PBS) y se incubaron toda la noche a 4° C. En todos los casos, luego de lavar 3 veces con buffer de lavado (PBS-0,05% Tween-20), las placas fueron incubadas con buffer de bloqueo (PBS-10% SFB) durante 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego, las muestras y la curva estándar, fueron incubadas por duplicado, como mínimo 2 hs a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Después de la incubación, las placas se lavaron 4 veces y se agregó el Ac secundario biotinilado que se incubó 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó el exceso de Ac y se incubó con estreptavidina-HRP durante 30 minutos. Finalmente, se realizaron 7 lavados y la reacción se reveló agregando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y sustrato 3,3',5,5'-tetramethylbenzidina (TMB) (BD OptEIA™, EEUU) La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en el lector de placas Microplate Reader 450 (BioRad, EEUU).

## INYECCIÓN INTRATÍMICA

### INYECCIÓN INTRATÍMICA CON COLORANTE FLUORESCENTE

Animales B6 fueron anestesiados con Ketamina (50 mg/ml)/Xilazina (20 mg/ml) (relación: 27,5 ul:13,5 ul en 200 µl finales de solución fisiológica estéril). Luego se realizó una incisión en el cuello del animal para acceder al timo sin perforar la cavidad pulmonar. Se inyectan, en los lóbulos tímicos, 8 µl del colorante eFluor 670 (eBiosciences número de catálogo: 65-0840) diluido en solución fisiológica a una concentración final de 0,5 mM. Se cierra la herida del animal con un adhesivo instantáneo (solución de cianoacrilato) y se los deja en una manta cálida para que recuperen la temperatura corporal hasta que despiertan. Los animales son sacrificados 5 o 7 días post inyección según corresponda. Este procedimiento se realiza en el día 7 dpi post infección con *T. cruzi* o el mismo día de infección con *C. albicans*. **(La técnica fue aprendida durante una pasantía en el laboratorio de la Dra. Ana Rosa Pérez, Dr. Eduardo Roggero, y Dr. Oscar Bottasso en el Instituto IDICER-CONICET en Rosario).**

### INYECCIÓN INTRATÍMICA DE TIMOCITOS CD45.1<sup>+</sup>

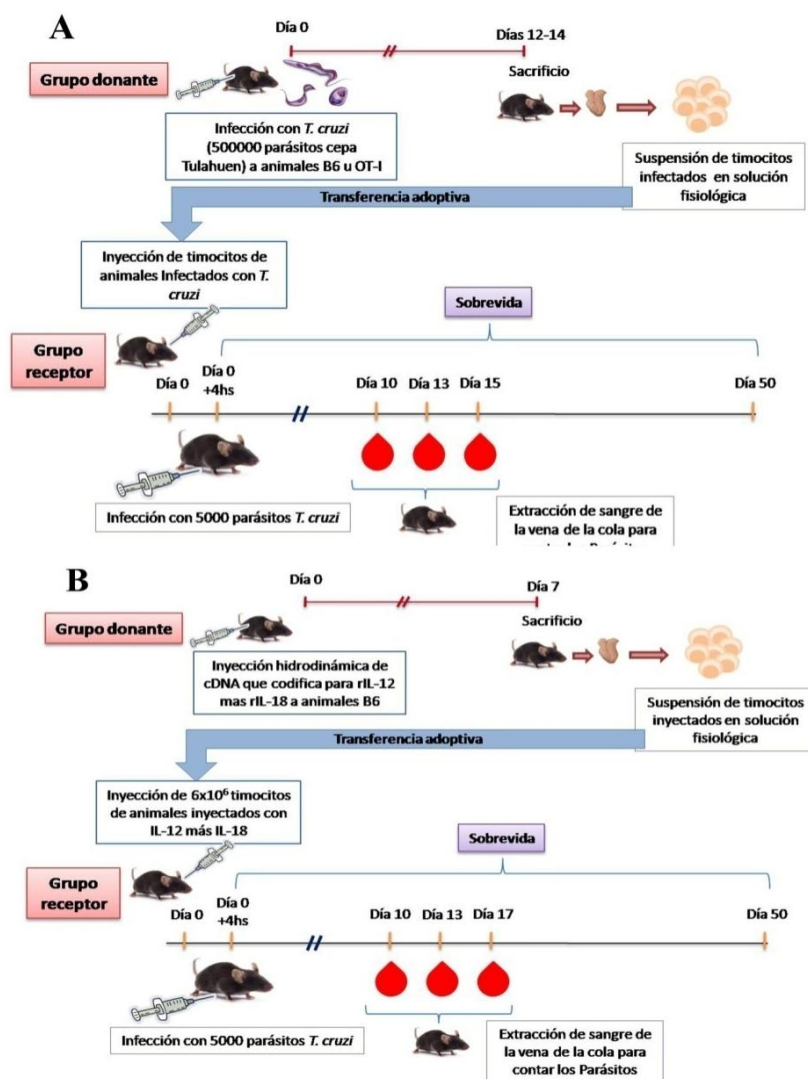
En primer lugar se extrajeron los timos de animales B6 CD45.1<sup>+</sup> controles (huésped: H) y se resuspendieron las células en PBS + 5%SFB. Se contaron mediante la coloración con Azul de Tripán en cámara de Neubauer y se resuspendieron  $10 \times 10^6$  timocitos en 20µl de solución fisiológica, suspensión de células para inyectar.

En segundo lugar, animales B6 (grupo receptor) control o infectados con *T. cruzi* fueron anestesiados con Ketamina (50 mg/ml)/Xilazina (20 mg/ml) (relación: 27,5 ul:13,5 ul en 200 µl finales de Solución fisiológica estéril). Luego se realizó una incisión en el cuello del animal para acceder al timo sin perforar la cavidad pulmonar. Se inyectaron, en los lóbulos tímicos, 20 µl de la suspensión de timocitos CD45.1<sup>+</sup>. Se cerró la herida del animal y se los dejó en una manta cálida para que recuperen la temperatura corporal hasta que despiertan. Finalmente, los animales son sacrificados 2 días post inyección. Este procedimiento se realiza en el día 13 post infección con *T. cruzi*.

## **EXPERIMENTOS DE SOBREVIDA**

### **DETERMINACIÓN DE LA SOBREVIDA**

A animales C57BL/6 y CD8 $\alpha$  KO se les transfirieron adoptivamente, por inyección retro-orbital,  $1-6 \times 10^6$  células en solución fisiológica, dependiendo del tratamiento del animal del cual se obtienen las células para transferir. Las células fueron obtenidas de una suspensión de timo de animales C57BL/6 WT u OT-I infectados con *T. cruzi* sacrificados en el día 14 dpi o inyectados hidrodinámicamente con los plásmidos de expresión de IL-12 mas IL-18 al día 7 post inyección. Luego de 4 horas de la TA se infectó a los animales receptores con 5000 parásitos de *T. cruzi* y se monitoreó la sobrevida hasta el día 50 post transferencia adoptiva. A partir del día 10 dpi se extrajo cada dos días sangre periférica de la vena de la cola y se realizó un recuento de parásitos (se obtuvieron 3 mediciones). Como grupo control se utilizaron animales C57BL/6 y CD8 $\alpha$  KO a los cuales solo se los infectó con 5000 parásitos de *T. cruzi* pero sin TA de células. A continuación se muestra el esquema experimental en la figura 38.



**Figura 37:** Esquemas experimentales para evaluar la funcionalidad de las células CD8 innatas durante la infección con *T. cruzi*. (A) Transferencia adoptiva de timocitos aislados de animales B6 u OT-I infectados con *T. cruzi*. (B) Transferencia adoptiva de timocitos aislados de animales B6 inyectados hidrodinámicamente con IL-12 más IL-18.

### DETERMINACIÓN DE LA PARASITEMIA

Para la determinación de la parasitemia a partir del 10 dpi, se contaron en cámara de Neubauer los tripomastigotes móviles presentes en una dilución 1/10 de la muestra de sangre con una solución de cloruro de amonio al 0.87% que lisa los glóbulos rojos. La muestra de sangre se extrajo realizando un pequeño corte en la cola del ratón y recogiéndola en un tubo cónico de 0,5ml con 4µl de heparina para que no se coagule la sangre.

## REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE ARN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qPCR)

### AISLAMIENTO DE ARN TOTAL

El ARN total se extrajo a partir de una suspensión de células de timo extraído de animales infectados con *T. cruzi* o inyectados con IL-12 + IL-18 utilizando el reactivo TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) en una proporción de 0,5 ml cada 5-10 x 10<sup>6</sup> células. Para extraer el ARN las muestras tratadas con TRIzol se separaron utilizando 0,1 ml de cloroformo por cada 0,5 ml de TRIzol, de esta manera se obtienen varias fases y el ARN queda en la fase acuosa. Posteriormente, se extrajo la fase a donde estaba presente el ARN y se precipitó con 0,25 ml de alcohol isopropílico. Finalmente el ARN se lavó con etanol al 75%, para disolver el ARN, y luego se resuspendió en agua destilada libre de ARNasa y ADNasa Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría, midiéndose la absorbancia de la muestra a 260 nm (BioTek, EEUU). Las muestras se mantuvieron a -80 °C hasta su análisis.

### TRATAMIENTO CON ADNasa Y OBTENCIÓN DE ADNc POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Antes de obtener el ADNc se hizo un tratamiento con ADNasa para evitar la contaminación de la muestra de ARN con ADN. Para esto se utilizó un kit de ADNasa Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). El protocolo de trabajo se siguió de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Para la síntesis de la cadena de ADN complementario (ADNc) se utilizó el Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription de Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific). El protocolo empleado consistió en preparar en hielo una mezcla de reacción con 1 µg de ARN total (templado); 2 µl de Random Primers RT 10X, 2 µl de Buffer RT 10X, 0,8 µl de Mix dNTP 25X (100 mM), 1 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase y agua destilada libre de ARNasa y ADNasa Invitrogen hasta un volumen final de 20 µl. El ciclado térmico se llevó a cabo en un termociclador Biometra T personal (Biometra, Alemania) y constó de 4 pasos: en primer lugar 10 minutos a 25°C, luego 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C y finalmente 30 minutos a 4°C. Las muestras de ADNc se almacenaron a -20°C.

PCR EN TIEMPO REAL

La cuantificación relativa del ADNc se realizó mediante PCR en tiempo real. Las muestras se corrieron por triplicado y los niveles del gen de interés fueron normalizados utilizando HPRT-1 como control endógeno, las veces de diferencia se calcularon utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (poner cita). Para ésta reacción se colocaron en cada tubo de reacción: SYBR® Green PCR Máster Mix 2X Applied Biosystems (Thermo Fisher scientific), primers específicos para el gen endógeno o el gen de interés y ADNc de la muestra a analizar, en un volumen final de 15  $\mu$ l. La reacción de PCR se ejecutó en el equipo para PCR múltiple en tiempo real Step one plus Applied Biosystems (Thermo fisher scientific). Las secuencias de los primers utilizados en este trabajo se detallan en la tabla 3.

**Tabla 3:** Secuencias de los primers de cada uno de los genes utilizados para PCR en tiempo real.

Gen	Secuencia de primers
<b>EOMES</b> (fragmento 76 pb)	Sense: 5'-CCTTCACTTCTCAGAGACACAGTT-3' Anti-sense: 5'-TCGATCTTTAGCTGGGTGATATCC-3'
<b>EOMES</b> (fragmento 125 pb)	Sense: 5'-ACCAATAACAAAGGTGCAAACAACAACAAC-3' Anti-sense: 5'-GGTTCATTCAAGTCCTCCACACCG-3'
<b>IL-15 (fragmento 113 pb)</b>	Sense: 5'-ACATCCATCTCGTGCTACTTGT-3' Anti-sense: 5'-GCCTCTGTTTTAGGGAGACCT-3'
<b>IL-15Ra</b> (fragmento 105 pb)	Sense: 5'-CCCACAGTTCCAAAATGACGA-3' Anti-sense: 5'-GCTGCCTTGATTTGATGTACCAG-3'

PCR EN TIEMPO REAL SEMICUANTITATIVA

Para algunos estudios se realizó una PCR en tiempo real pero utilizando un procedimiento que contempla una amplificación de un número fijo de ciclos.

La expresión génica para IL-15, IL-15R alfa fue evaluada con un ensayo semicuantitativo de RT-PCR. Brevemente, el ARN fue tratado con DNAsa I y luego se realizó la transcripción reversa utilizando 1 $\mu$ g de ARN usando primers al azar como cebadores. Para la PCR en tiempo real semicuantitativa se utilizó el ADNc junto con el kit

para el ensayo de expresión TaqMan R de Life Technologies con los cebadores específicos para cada gen. Todas las reacciones se llevaron a cabo en una placa de 96 pocillos en el equipo 7300 Real Time PCR System de Life Technologies. La expresión de los genes se normalizó utilizando HPRT como gen control.

### ANÁLISIS PARA LA CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE GENES

La amplificación por PCR en tiempo real permite realizar la cuantificación de un determinado gen de interés. En nuestro caso, se recurrió a la cuantificación relativa, utilizando un gen de referencia que presente una expresión constitutiva (genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican proteínas que son esenciales, en nuestro caso se empleó el gen de la GADPH). En este trabajo de tesis determinaremos la cuantificación relativa de un gen de interés aplicando el método de  $\Delta\Delta CT$  [87, 88]. En este método, se establece un parámetro denominado CT, que se define como el número de ciclo de la reacción de PCR en el cual la señal de fluorescencia supera un umbral arbitrario, determinado en la zona de fase exponencial de la reacción de amplificación<sup>[88]</sup>. Para cada gen evaluado, los valores de CT se normalizan con los valores de CT correspondientes al gen de referencia, utilizando la siguiente fórmula:

$$\Delta CT = CT (\text{gen de interés}) - CT (\text{gen de referencia})$$

Luego, se obtiene la expresión relativa del gen de interés en una muestra determinada expresando el  $\Delta CT$  como  $2^{-\Delta CT}$ <sup>[88]</sup>. El método también se aplica para determinar la expresión relativa de un gen en dos condiciones o muestras diferentes:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{condición A}) - \Delta CT (\text{condición B})$$

De la misma manera, la expresión relativa del gen de interés se expresa como  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (RQ)<sup>[88]</sup>.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism (versión 5.00). Se utilizaron los siguientes test estadísticos: ANOVA de una o dos colas, según correspondía para cada situación experimental y Test T de student. Los resultados se presentaron como promedio  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Para los experimentos de sobrevida se utilizó el test de Gehan-Brelow-Wilcoxon. Valores de \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$  se los consideró estadísticamente significativos.



# **BIBLIOGRAFÍA**

1. Izumi Ohigashi, Mina Kozai, and Y. Takahama, *Development and developmental potential of cortical thymic epithelial cells*. Immunological Reviews, 2016. **271**: p. 10–22.
2. Boehm, T., *Thymus development and function*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(2): p. 178-84.
3. Boehm, T. and J.B. Swann, *Thymus involution and regeneration: two sides of the same coin?* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(11): p. 831-8.
4. Janeway, C.A., *Immunobiology, the Immune System in Health and Disease* 6ed. 2004: Churchill Livingstone. 257-320.
5. Beth Lucas, et al., *Control of the thymic medulla and its influence on abT-cell development*. Immunological Reviews, 2016. **271**: p. 23-37.
6. Dominguez-Gerpe, L. and M. Rey-Mendez, *Evolution of the thymus size in response to physiological and random events throughout life*. Microsc Res Tech, 2003. **62**(6): p. 464-76.
7. Hale, J.S., et al., *Thymic output in aged mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(22): p. 8447-52.
8. Alexandropoulos, K. and N.M. Danzl, *Thymic epithelial cells: antigen presenting cells that regulate T cell repertoire and tolerance development*. Immunol Res, 2012. **54**(1-3): p. 177-90.
9. Ladi, E., et al., *Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection*. Nat Immunol, 2006. **7**(4): p. 338-43.
10. Surh, C.D. and J. Sprent, *Homeostasis of naive and memory T cells*. Immunity, 2008. **29**(6): p. 848-62.
11. Fink, P.J., *The biology of recent thymic emigrants*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 31-50.
12. Fink, P.J. and D.W. Hendricks, *Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(8): p. 544-9.
13. Hodge, D.L., et al., *MCP-1/CCR2 interactions direct migration of peripheral B and T lymphocytes to the thymus during acute infectious/inflammatory processes*. Eur J Immunol, 2012. **42**(10): p. 2644-54.
14. Juliana de Meis, et al., *Differential Regional Immune Response in Chagas Disease*. Plos Neglected Tropical Diseases, 2009. **3**(7): p. 1-9.
15. Savino, W., *The Thymus Is a Common Target Organ in Infectious Diseases*. Plos Pathogens, 2006. **2**(6): p. 0472-0483.

16. Nunes-Alves, C., et al., *Tolerance has its limits: how the thymus copes with infection*. Trends Immunol, 2013. **34**(10): p. 502-10.
17. Nobrega, C., et al., *T cells home to the thymus and control infection*. J Immunol, 2013. **190**(4): p. 1646-58.
18. Reiley, W.W., et al., *Maintenance of peripheral T cell responses during Mycobacterium tuberculosis infection*. J Immunol, 2012. **189**(9): p. 4451-8.
19. Vogel, A.B., et al., *Highly pathogenic influenza virus infection of the thymus interferes with T lymphocyte development*. J Immunol, 2010. **185**(8): p. 4824-34.
20. Perez, A.R., et al., *Thymus atrophy during Trypanosoma cruzi infection is caused by an immuno-endocrine imbalance*. Brain Behav Immun, 2007. **21**(7): p. 890-900.
21. M. Borges , et al., *Molecular and cellular mechanisms of Mycobacterium avium-induced thymic atrophy*. J Immunol, 2012. **189**(7): p. 3600-8.
22. Li, L., et al., *IL-12 Inhibits Thymic Involution by Enhancing IL-7- and IL-2-Induced Thymocyte Proliferation*. J. Immunol., 2004. **172**(5): p. 2909-16.
23. Nakanishi, K., *Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu*. Cytokine and Growth Factor Reviews, 2001. **12**: p. 53–72.
24. Munk, R.B., et al., *Antigen-independent IFN-gamma production by human naive CD4 T cells activated by IL-12 plus IL-18*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e18553.
25. Bou Ghanem, E.N., C.C. Nelson, and S.E. D'Orazio, *T cell-intrinsic factors contribute to the differential ability of CD8+ T cells to rapidly secrete IFN-gamma in the absence of antigen*. J Immunol, 2011. **186**(3): p. 1703-12.
26. 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.
27. d'Ostiani, C.F., *Dendritic Cells Discriminate between Yeasts and Hyphae of the Fungus Candida albicans : Implications for Initiation of T Helper Cell Immunity In Vitro and In Vivo*. J. Exp. Med., 2000. **191**: p. 1661–73.
28. Rodriguez-Galán MC, et al., *Synergistic Effect of IL-2, IL-12, and IL-18 on Thymocyte Apoptosis and Th1/Th2 Cytokine Expression*. J. Immunol., **174**: 2005: p. 2796-804.
29. Rodriguez-Galan, M.C., et al., *Coexpression of IL-18 strongly attenuates IL-12-induced systemic toxicity through a rapid induction of IL-10 without affecting its antitumor capacity*. J Immunol, 2009. **183**(1): p. 740-8.

30. Barbara J. Whalen, et al., *Type 1 cytokines polarize thymocytes during T cell development in adult thymus organ cultures*. *Autoimm*, 2003. **20**(1): p. 27-42.
31. Kikkawa E, et al., *T(h)1/T(h)2 cell differentiation of developing CD4 single-positive thymocytes*. *Int Immunol.*, 2002. **14**: p. 943-951.
32. Cox, M.A., L.E. Harrington, and A.J. Zajac, *Cytokines and the inception of CD8 T cell responses*. *Trends Immunol*, 2011. **32**(4): p. 180-6.
33. Prince, A.L., et al., *Development of innate CD4+ and CD8+ T cells in Itk-deficient mice is regulated by distinct pathways*. *J Immunol*, 2014. **193**(2): p. 688-99.
34. Lee, Y.J., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Alternative memory in the CD8 T cell lineage*. *Trends Immunol*, 2011. **32**(2): p. 50-6.
35. Lee, Y.J., et al., *Generation of PLZF+ CD4+ T cells via MHC class II-dependent thymocyte-thymocyte interaction is a physiological process in humans*. *J Exp Med*, 2010. **207**(1): p. 237-46.
36. Min, H.S., et al., *MHC class II-restricted interaction between thymocytes plays an essential role in the production of innate CD8+ T cells*. *J Immunol*, 2011. **186**(10): p. 5749-57.
37. Rafei, M., et al., *Development and function of innate polyclonal TCRalpha+ CD8+ thymocytes*. *J Immunol*, 2011. **187**(6): p. 3133-44.
38. Weinreich, M.A., et al., *T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8+ T cells*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(8): p. 709-16.
39. Broussard, C., et al., *Altered development of CD8+ T cell lineages in mice deficient for the Tec kinases Itk and Rlk*. *Immunity*, 2006. **25**(1): p. 93-104.
40. Berg, L.J., *Signalling through TEC kinases regulates conventional versus innate CD8+T-cell development*. *Nature Immunol*, 2007. **7**: p. 479-85.
41. Jacomet, F., et al., *Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8(+) KIR/NKG2A(+) T cells in human adults and cord blood samples*. *Eur J Immunol*, 2015. **45**(7): p. 1926-33.
42. Berg, L.J., *Signaling pathways that regulate T cell development and differentiation*. *J Immunol*, 2012. **189**(12): p. 5487-8.
43. Urdahl, K.B., J.C. Sun, and M.J. Bevan, *Positive selection of MHC class Ib-restricted CD8(+) T cells on hematopoietic cells*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(8): p. 772-9.
44. Yamada, H., et al., *Positive selection of self-antigen-specific CD8+ T cells by hematopoietic cells*. *Eur J Immunol*, 2013. **43**(8): p. 2033-42.

45. Cho, H., et al., *Positive selecting cell type determines the phenotype of MHC class Ib-restricted CD8<sup>+</sup> T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(32): p. 13241-6.
46. Kurzweil, V., A. LaRoche, and P.M. Oliver, *Increased peripheral IL-4 leads to an expanded virtual memory CD8<sup>+</sup> population*. J Immunol, 2014. **192**(12): p. 5643-51.
47. Renkema, K.R., et al., *IL-4 sensitivity shapes the peripheral CD8<sup>+</sup> T cell pool and response to infection*. J Exp Med, 2016. **213**(7): p. 1319-29.
48. Carty, S.A., G.A. Koretzky, and M.S. Jordan, *Interleukin-4 regulates eomesodermin in CD8<sup>+</sup> T cell development and differentiation*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e106659.
49. Berg, R.E., et al., *Memory CD8<sup>+</sup> T cells provide innate immune protection against Listeria monocytogenes in the absence of cognate antigen*. J Exp Med, 2003. **198**(10): p. 1583-93.
50. Liu, B., et al., *Severe influenza A(H1N1)pdm09 infection induces thymic atrophy through activating innate CD8(+)/CD44(hi) T cells by upregulating IFN-gamma*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1440.
51. Song, C., et al., *Eomesodermin is required for antitumor immunity mediated by 4-1BB-agonist immunotherapy*. Oncoimmunology, 2014. **3**(1): p. e27680.
52. Soudja, S.M., et al., *Inflammatory monocytes activate memory CD8(+) T and innate NK lymphocytes independent of cognate antigen during microbial pathogen invasion*. Immunity, 2012. **37**(3): p. 549-62.
53. Chu, T., et al., *Bystander-activated memory CD8 T cells control early pathogen load in an innate-like, NKG2D-dependent manner*. Cell Rep, 2013. **3**(3): p. 701-8.
54. Tietze, J.K., et al., *Delineation of antigen-specific and antigen-nonspecific CD8(+) memory T-cell responses after cytokine-based cancer immunotherapy*. Blood, 2012. **119**(13): p. 3073-83.
55. Hu, J., et al., *CD8<sup>+</sup>T cell-specific induction of NKG2D receptor by doxorubicin plus interleukin-12 and its contribution to CD8<sup>+</sup>T cell accumulation in tumors*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 34.
56. Wong, H.C., E.K. Jeng, and P.R. Rhode, *The IL-15-based superagonist ALT-803 promotes the antigen-independent conversion of memory CD8<sup>+</sup> T cells into innate-like effector cells with antitumor activity*. Oncoimmunology, 2013. **2**(11): p. e26442.
57. Stempin, C.C., et al., *Cruzipain and SP600125 induce p38 activation, alter NO/arginase balance and favor the survival of Trypanosoma cruzi in macrophages*. Acta Trop, 2008. **106**(2): p. 119-27.

58. Nayar, R., *TCR signaling via Tec kinase ITK and interferon regulatory factor 4 (IRF4) regulates CD8+ T-cell differentiation*. PNAS, 2012.
59. Anderson DM, et al., *Functional Characterization of the Human Interleukin-15 Receptor  $\alpha$  Chain and Close Linkage of IL15RA and IL2RA Genes*. The Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**: p. 29862–29869.
60. Lodolce JP, et al., *IL-15 Receptor Maintains Lymphoid Homeostasis by Supporting Lymphocyte Homing and Proliferation*. Immunity, 1998. **9**: p. 669–676.
61. Qiao, Y., et al., *Innate-like CD4 T cells selected by thymocytes suppress adaptive immune responses against bacterial infections*. Open J Immunol, 2012. **2**(1): p. 25-39.
62. Weinreich, M.A., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Postselection thymocyte maturation and emigration are independent of IL-7 and ERK5*. J Immunol, 2011. **186**(3): p. 1343-7.
63. Huang, W., et al., *ITK tunes IL-4-induced development of innate memory CD8+ T cells in a gammadelta T and invariant NKT cell-independent manner*. J Leukoc Biol, 2014. **96**(1): p. 55-63.
64. Berg, R.E. and J. Forman, *The role of CD8 T cells in innate immunity and in antigen non-specific protection*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(3): p. 338-43.
65. Gordon, S.M., et al., *Requirements for eomesodermin and promyelocytic leukemia zinc finger in the development of innate-like CD8+ T cells*. J Immunol, 2011. **186**(8): p. 4573-8.
66. Park, H.J., et al., *Effect of IL-4 on the Development and Function of Memory-like CD8 T Cells in the Peripheral Lymphoid Tissues*. Immune Netw, 2016. **16**(2): p. 126-33.
67. Perez, A.R., et al., *TNF- $\alpha$  is involved in the abnormal thymocyte migration during experimental Trypanosoma cruzi infection and favors the export of immature cells*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e34360.
68. Stanley, S.K., et al., *Human immunodeficiency virus infection of the human thymus and disruption of the thymic microenvironment in the SCID-hu mouse*. J Exp Med, 1993. **178**(4): p. 1151-63.
69. Mendes-da-Cruz, D.A., et al., *Altered thymocyte migration during experimental acute Trypanosoma cruzi infection: combined role of fibronectin and the chemokines CXCL12 and CCL4*. Eur J Immunol, 2006. **36**(6): p. 1486-93.

- 
70. Nobrega, C., et al., *Dissemination of mycobacteria to the thymus renders newly generated T cells tolerant to the invading pathogen*. J Immunol, 2010. **184**(1): p. 351-8.
  71. Rafei, M., et al., *Differential effects of gammac cytokines on postselection differentiation of CD8 thymocytes*. Blood, 2013. **121**(1): p. 107-17.
  72. De Calisto, J., et al., *SAP-Dependent and -Independent Regulation of Innate T Cell Development Involving SLAMF Receptors*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 186.
  73. Georgiev, H., et al., *CD155/CD226-interaction impacts on the generation of innate CD8(+) thymocytes by regulating iNKT-cell differentiation*. Eur J Immunol, 2016. **46**(4): p. 993-1003.
  74. Huang, W., J. Hu, and A. August, *Cutting edge: innate memory CD8+ T cells are distinct from homeostatic expanded CD8+ T cells and rapidly respond to primary antigenic stimuli*. J Immunol, 2013. **190**(6): p. 2490-4.
  75. Oghumu, S., et al., *Distinct populations of innate CD8+ T cells revealed in a CXCR3 reporter mouse*. J Immunol, 2013. **190**(5): p. 2229-40.
  76. Jameson, S.C., Y.J. Lee, and K.A. Hogquist, *Innate memory T cells*. Adv Immunol, 2015. **126**: p. 173-213.
  77. Martinet, V., et al., *Type I interferons regulate eomesodermin expression and the development of unconventional memory CD8(+) T cells*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7089.
  78. Popescu, I., et al., *T-bet:Eomes balance, effector function, and proliferation of cytomegalovirus-specific CD8+ T cells during primary infection differentiates the capacity for durable immune control*. J Immunol, 2014. **193**(11): p. 5709-22.
  79. Grégoire Lauvau and S. Goriely, *Memory CD8+ T Cells: Orchestrators and Key Players of Innate Immunity?* PLoS Pathog, 2016. **12**(9): e1005722.
  80. Terra, R., N. Labrecque, and C. Perreault, *Thymic and extrathymic T cell development pathways follow different rules*. J Immunol, 2002. **169**(2): p. 684-92.
  81. Lee, A., et al., *IL-4 Induced Innate CD8+ T Cells Control Persistent Viral Infection*. PLoS Pathog, 2015. **11**(10): p. e1005193.
  82. Haluszczak, C., et al., *The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion*. J Exp Med, 2009. **206**(2): p. 435-48.

- 
83. Sosinowski, T., et al., *CD8alpha+ dendritic cell trans presentation of IL-15 to naive CD8+ T cells produces antigen-inexperienced T cells in the periphery with memory phenotype and function*. J Immunol, 2013. **190**(5): p. 1936-47.
  84. Stoycheva, D., et al., *IFN-gamma regulates CD8+ memory T cell differentiation and survival in response to weak, but not strong, TCR signals*. J Immunol, 2015. **194**(2): p. 553-9.
  85. Leav, B.A., et al., *An early intestinal mucosal source of gamma interferon is associated with resistance to and control of Cryptosporidium parvum infection in mice*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 8425-8.
  86. F Liu, Y.S.a.D.L., *Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA*. Gene Therapy, 1999. **6**: p. 1258–1266.
  87. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
  88. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.



# **PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**

**Publicaciones en revistas con referato**

1. **Natalia S. Baez**, Fabio Cerbán, Constanza Savid Frontera, Eva Acosta Rodríguez, Jimena Tosello, Howard Young, María Cecilia Rodríguez-Galán. “*Deviation from conventional to Innate CD8<sup>+</sup> T cells development in the thymus under systemic inflammatory-infectious processes*”. **En revisión** (2016).
2. Bibiana Barrios, **Natalia S. Baez**, Della Reynolds, Pablo Iribarren, Hugo Cejas, Howard A. Young and María Cecilia Rodríguez-Galán. “*Abrogation of TNF- $\alpha$  production is crucial for suppressing side effects due to systemic expression of IL-12 in cancer immunotherapy.*” PLoS One. 2014 Feb 28; 9(2).
3. Leticia V. Bentancor, María P. Mejías, Alípio Pinto, Marcos F. Bilén, Roberto Meiss, María C. Rodríguez-Galán, **Natalia S. Baez**, Luciano P. Pedrotti, Jorge Goldstein, Pablo D. Ghiringhelli, Marina S. Palermo “*Promoter Sequence of Shiga Toxin 2 (Stx2) Is Recognized In Vivo leading to Production of Biologically Active Stx2*” mBio. 2013. 4(5).
4. Deborah L. Hodge, Della Reynolds D, Fabio M. Cerbán, Silvia G. Correa, **Natalia S. Baez**, Howard A. Young, María Cecilia Rodríguez-Galán, MC. “*MCP-1/CCR2 interactions direct migration of peripheral B and T lymphocytes to the thymus during acute infectious/inflammatory processes*”. European Journal of Immunology. 2012. **42**: 1–11.
5. Mario J. Bibolini, Natali L. Chanaday, **Natalia S. Baez**, Alicia L. Degano, Clara G. Monferran, Germán A. Roth. “*Inhibitory role of diazepam on autoimmune inflammation in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis*”. Neuroscience. 2011; **199**:421-8.

## **Participación en Congresos**

1. **“Immunologic studies in a model of Autism Spectrum Disorders (ASDs)”**.

**Natalia S. Baez**, Alicia Degano. Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC, UNC-CONICET), Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. XXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias (SAN). Huerta Grande, Córdoba. 18 al 22 de Octubre de 2011.

2. **“Maduración y diferenciación Th1 de timocitos CD4 y CD8 simple positivos (SP) en situaciones inflamatorias/infecciosas”**

**Natalia S. Baez**, Della Reynolds, Fabio Cerbán, Silvia G. Correa, Howard A. Young, María Cecilia Rodríguez-Galán. Centro de investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI- UNC-CONICET). Area de Inmunología. Departamento de Bioquímica Clínica Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. LVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología – SAI. Mar del Plata, Buenos Aires, 14 al 17 de Noviembre 2012.

3. **“Cambios en los subtipos celulares presentes en el timo después de procesos sistémicos inflamatorias/infecciosas de tipo Th1”**

**Natalia S. Baez**, Fabio Cerbán, María Cecilia Rodríguez-Galán. Centro de investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI- UNC-CONICET). Area de Inmunología. Departamento de Bioquímica Clínica Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología – SAI. Los Cocos, Córdoba, 7 al 9 de Noviembre 2013

4. **“Alterations in thymocytes populations during infectious/inflammatory conditions”**

**Natalia S. Baez**, Fabio Cerbán, Constanza Savid Frontera, María Cecilia Rodríguez-Galán. Centro de investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-UNC-CONICET). Area de Inmunología. Departamento de Bioquímica Clínica Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. LIX REUNIÓN

CIENTÍFICA ANUAL Sociedad Argentina de Investigación Clínica - LXII REUNIÓN ANUAL Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, Buenos Aires, 19 al 22 de Noviembre 2014.

5. **“Appearance of innate T cells in thymus in infectious/inflammatory conditions”**  
**Natalia S. Baez**, Fabio Cerbán, Constanza Savid Frontera, María Cecilia Rodríguez-Galán. Centro de investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-UNC-CONICET). Area de Inmunología. Departamento de Bioquímica Clínica Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. LXIII REUNIÓN ANUAL Sociedad Argentina de Inmunología. Buenos aires, 18 al 21 de Noviembre 2015.
  
6. **“Systemic IL-12 as an antitumor agent in cancer therapy”**  
 Constanza Savid Frontera, **Natalia S. Baez**, María Cecilia Rodríguez-Galán. Centro de investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI- UNC-CONICET). Area de Inmunología. Departamento de Bioquímica Clínica Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. LXIII REUNIÓN ANUAL Sociedad Argentina de Inmunología. Buenos aires, 18 al 21 de Noviembre 2015.
  
7. **“Desarrollo de células T innatas en timo bajo condiciones infecciosas/inflamatorias sistémicas”**  
**Natalia S. Baez**, Constanza Savid Frontera, Fabio Cerbán y María Cecilia Rodríguez Galán. Centro de investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-UNC-CONICET). Area de Inmunología. Departamento de Bioquímica Clínica Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC); LXIV REUNIÓN ANUAL Sociedad Argentina de Inmunología; XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Mar del Plata, 16 al 19 de Noviembre 2016. **Trabajo galardonado con el PREMIO “DR. LEONARDO SATZ” AL MEJOR TRABAJO EN INMUNOLOGÍA 2016.**
  
8. **“Innate CD8 T cells: an unexplored line of defense of the immune system in cancer?”**. Constanza Savid Frontera, **Natalia S. Baez**, María Cecilia Rodríguez

galan. Centro de investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-UNC-CONICET). Area de Inmunología. Departamento de Bioquímica Clínica Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC); XLIV REUNIÓN ANUAL Sociedad Argentina de Inmunología; XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Mar del Plata, 16 al 19 de Noviembre 2016.