



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



Universidad Nacional de Córdoba  
Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Bioquímica Clínica

Centro de Investigaciones en  
Bioquímica Clínica e Inmunología  
(CIBICI - CONICET)

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Los linfocitos B y las células plasmáticas  
regulan la respuesta inflamatoria  
en la infección con *Trypanosoma cruzi***

Bioquímica Melisa Gorosito Serrán

Córdoba, Argentina

- 2016 -



**Directora de Tesis**

---

**Dra. Prof. Adriana Gruppi**

**Comisión Asesora**

---

**Dra. Inés Albesa**

*Graciela Borioli*

**Dra. Graciela Borioli**

*Belkys Maletto*

**Dra. Belkys Maletto**

**Evaluador Externo**

---

*Oscar Bottasso*

**Dr. Oscar Bottasso**

*Este trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT-UNC), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FonCyT) y el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (National Institute of Health - NIH).*

*A mi mamá,*

*tía*

*y abuelo.*

## AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar quiero agradecerle a la Dra. Adriana Gruppi, mi directora de tesis, el brindarme tal increíble oportunidad y acompañarme a capa y espada en todo este proceso de aprendizaje. Adri, gracias por ser sumamente generosa con tus conocimientos y tus ideas; innovadora, comprometida con y pendiente de tanto tus becarios como del resto del grupo y de los miembros del instituto. Además, sos una persona con principios, ética y valores ejemplares; lograste mi respeto y admiración casi al instante de conocerte. ¡Infinitas Gracias Adri!

Además me es sumamente necesario agradecerles al resto de los miembros de mi comisión de tesis, la Dra. Belkys Maletto, la Dra. Graciela Borioli y la Dra. Inés Albesa. Muchísimas gracias por su excelente predisposición, sus preguntas y sus precisas sugerencias durante todos estos años. Gracias además por las correcciones del manuscrito y la discusión que me brindaron. Gracias también al Dr. Oscar Botasso por la lectura y evaluación de esta tesis doctoral.

En segundo lugar, quiero agradecerles a las otras directoras y compañeros que integran e integraron mi grupo de trabajo. Gracias Eva, Caro, Dani, Carito, Ceci, Jime, Facu, Cris, Fer, Cintia, Coti y Sabri. Gracias por incansables debates, enseñarme de todo, trabajar pacientemente codo a codo conmigo y hacerme crecer tanto en lo profesional como en lo personal. Gracias también Ceci y Cris por simplificarnos el trabajo y su inagotable paciencia. Gracias Luchi y Tef por hacernos pensar diferente. ¡Innumerables Gracias Grumos!

En tercer lugar, me gustaría agradecer y reconocer el trabajo de todo el personal de apoyo del instituto, que hacen que todo se mantenga a flote los 365 días al año las 24 horas. Miles de gracias Ale, Laura, Sr. Navarro, Fabri, Fede, Diego, Caro, Vicky; y gracias especiales Paula y Pilar, por su extrema paciencia y contención, y excelente predisposición. Gracias a todos por enseñarme los ABCs del CIBICI. No me podría olvidar tampoco del apoyo diario que recibimos de Adri, Martín y Laura. Muchas gracias gracias gracias a todos por "rescatarme" más de una vez.

Y por último, pero no por ello menos importante, quiero agradecerles al resto de los miembros que forman y formaron parte de este instituto: Cinthia, Pilar, Fabio, Susana, Cristina, Horacio, Roxy, Eli Baigorri, Lauri, Colo, Natalia, Patricia, Constanza, Augusto, Nicopon, David, Andrés, Lili, Fernanda, Xime, Yamile, Laura, Caro, Paula, Emilse,

Emiliano, Janet, Paula, Lisa, Sole, Nati, Gonzalo, Iva, Dra. Riera, Virginia, Cecilia, Florencia, Leou, Cono, Claudia, Lucas, Ceci Vigezzi, Rubén, Silvia, Mariana, Bibi, David, Laura, Luciano, Ángela, Magda, Nicolás, Pablo, Ana, Javier, Emi Gaviglio, Dani, Cande, Anita, Claudio, Vicky, Caro, Inés, Flor, Fer, Sofi, Rachel, Anita, Mer, Virginia, Gabriel, Cristina, Gabriel, Sandra, Oscar, Elina, Meli, Ale García, Lore, Vero, Diana, Héctor, Martín, Vero, Santi, Laura, Leonardo, Laura, Dai, Cristian Falcón, Cecilia, Luciana, Hernán, Pablo, Vanina, José, Paulo, Nubia, Nico, María del Mar, Mónica, Susana, Luci, Jesi, Mariano, José, Alejandro, Claudia, Ana, Danilo, Alex, Emilia, Gastón, Flor, Flor, Sofía, Graciela, Ana, Magali, Juan Pablo, Lilian, Jimena, Flor, Chicho, Ana, Victoria, AnaCaro, Ana Belén, Claudia, Nico Gigena, Vani Alamino, Laura, Ramón, Valeria, Lidwina, Johanna, Andu, Euge, Rocío, Gustavo, Constanza, Cecilia, Paula, Maxi, Gustavo, Vicky.

Gracias por generar un ambiente de trabajo ameno, por nutrirnos con sus ejemplos y enseñanzas, por su compañerismo, por su gran predisposición en los préstamos de turnos, de reactivos, de hombros, orejas y manos...

Gracias a todos por contribuir a que esta tesis doctoral haya sido un proceso de aprendizaje tan feliz para mí.

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS .....	15
RESUMEN.....	19
1] INTRODUCCIÓN .....	25
1.1] Enfermedad de Chagas: Generalidades .....	25
1.2] Modelos Experimentales .....	26
1.3] Respuesta Inmune frente a la infección con el <i>T. cruzi</i> .....	27
1.3.1] Respuesta pro-inflamatoria de tipo 1: Mecanismos de Protección contra el <i>T. cruzi</i> ..	27
1.3.2] Respuesta pro-inflamatoria de tipo 1: Patogenia .....	30
1.3.3] Participación de los linfocitos B en la respuesta inmune frente a la infección con <i>T. cruzi</i> .....	31
1.4] Regulación de la respuesta inmune en la Enfermedad de Chagas experimental y humana .....	33
1.4.1] Respuesta Regulatoria dependiente de IL10 .....	34
1.4.2] Participación de IL17 en la respuesta regulatoria .....	36
1.4.3] Respuesta regulatoria ejercida por Linfocitos T regulatorios o Tregs .....	36
1.4.4] Participación de las Células Mieloides Supresoras en la regulación de la inmunidad en la infección con <i>T. cruzi</i> .....	38
1.4.5] Inducción de Respuesta Regulatoria como Mecanismo de Evasión por el <i>T. cruzi</i> .....	39
1.4.6] Inmunosupresión y respuesta de linfocitos B en la infección con <i>T. cruzi</i> .....	40
1.5] Linfocitos B Regulatorios .....	40
1.5.1] Mecanismos Regulatorios: Secreción de IL10 .....	40
1.5.2] Mecanismos Regulatorios de LiB ejercidos a través de la Secreción de citoquinas diferentes a IL10 .....	43
1.5.3] Regulación de la inmunidad por LiB a través de Moléculas de Superficie .....	43
1.5.4] Linfocitos B Regulatorios en la Infección con <i>T. cruzi</i> .....	45
2] HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	49
3] RESULTADOS .....	53
3.1] Ratones muMT infectados con <i>T. cruzi</i> presentan prematura mortalidad y exacerbada respuesta pro-inflamatoria.....	53
3.2] Los LiTCD4 <sup>+</sup> de ratones muMT infectados presentan un perfil pro-inflamatorio .....	61
3.3] Los LiT CD4 <sup>+</sup> de ratones muMT influyen/modifican el fenotipo de los LiT CD4 <sup>+</sup> de ratones WT infectados .....	67
3.4] Durante la infección con <i>T. cruzi</i> , se inducen poblaciones de LiB que podrían tener funciones regulatorias .....	69
3.5] Las CP generadas en la infección con <i>T. cruzi</i> serían capaces de regular la secreción de TNF e IFN $\gamma$ <i>in vitro</i> vía PDL1 .....	77
4] DISCUSIÓN .....	97
4.1] La ausencia de LiB condiciona la respuesta inmune en la infección con <i>T. cruzi</i> y frente a distintos microorganismos .....	97
4.2] TNF como mediador de la mortalidad y morbilidad en la infección con <i>T. cruzi</i> .....	99
4.3] LiT CD4 <sup>+</sup> patogénicos en la enfermedad de Chagas .....	103
4.4] CP PDL1 <sup>+</sup> regulatorias en la infección con <i>T. cruzi</i> .....	105
4.5] Expresión de PDL1 y capacidad regulatoria .....	108
4.6] Amplificación <i>in vitro</i> de células de la progenie B PDL1 <sup>+</sup> y capacidad regulatoria .....	109
4.7] Localización EF de las CP PDL1 <sup>+</sup> .....	110
5] CONCLUSIONES .....	115
6] MATERIALES Y MÉTODOS.....	119
6.1] Animales de Experimentación .....	119
6.2] Reactivos .....	120

6.3] Parásitos e Infección.....	123
6.4] Tratamientos <i>in vivo</i> .....	125
6.5] Muestras de sangre y plasma .....	125
6.6] Obtención de Suspensiones celulares provenientes de diferentes órganos .....	126
6.7] Cultivos celulares.....	127
6.8] Purificación de poblaciones celulares .....	130
6.9] Citometría de flujo .....	131
6.10] Determinación de diferentes proteínas en sobrenadantes de cultivos, plasma y lisados celulares.....	132
6.11] Ensayos de biología molecular.....	133
6.12] Estudios histológicos .....	134
6.13] Análisis estadísticos.....	134
7] BIBLIOGRAFÍA.....	137
8] PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	153

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

<i>Figura 1: Ratones muMT infectados presentaron una prematura mortalidad pero fueron capaces de controlar la replicación del T. cruzi.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 2: Ratones muMT infectados con T. cruzi presentaron un aumento significativo en la concentración plasmática de IFN<math>\gamma</math>, TNF y TGF<math>\beta</math>.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 3: Ratones muMT infectados presentaron alteraciones clínicas y bioquímicas asociadas a elevados niveles de TNF en plasma.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 4: El bloqueo de TNF promovió la recuperación del peso corporal en los primeros días pi de los ratones muMT infectados, pero a tiempos tardíos los ratones murieron por exacerbación de la respuesta tipo 1.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 5: Ratones muMT infectados presentaron un mayor porcentaje y número relativo de células productoras de TNF en bazo y ganglios linfáticos.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 6: Ratones muMT infectados presentaron diferencias en la composición de la población secretora de TNF con respecto a ratones WT infectados.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 7: LiT CD4<sup>+</sup> de ratones muMT infectados presentaron un perfil pro-inflamatorio más exacerbado que los LiT CD4<sup>+</sup> de ratones WT infectados.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 8: La transferencia de LiT CD4<sup>+</sup> de ratones muMT infectados a ratones WT infectados alteró el perfil de los LiT CD4<sup>+</sup> en los ratones receptores y aumentó la secreción de IFN<math>\gamma</math> sistémico.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 9: En la infección con T. cruzi se produjo un aumento en el número de LiB de CG y PL/CP en bazo y ganglio pero no en hígado.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 10: En la infección con T. cruzi los LiB secretaron IL10, TGF<math>\beta</math> e IL6.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 11: Los LiB y CP expresaron PDL1 y PDL2 e incrementaron la expresión de PDL1 en respuesta a la infección con T. cruzi.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 12: Los LiB fueron capaces de regular in vitro a células secretoras de TNF a través de un mecanismo dependiente de contacto celular.....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 13: La vía PD1/PDL1 fue capaz de regular in vitro la secreción de TNF.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 14: Poblaciones celulares presentes en esplenocitos de ratones infectados con T. cruzi post-depleción de LiB, PL/CP o PDL1<sup>high</sup> y PDL1<sup>low</sup>.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 15: Las CP fueron capaces de regular células secretantes de TNF e IFN<math>\gamma</math> presentes en esplenocitos de ratones WT infectados.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 16: Las CP de ratones infectados con T. cruzi se ubicaron en focos EF, expresan CD11c, PDL1 y otros receptores asociados a funciones regulatorias como PDL2 y CD39.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 17: PDL1 se indujo en LiB a través de ligandos de Toll, el T. cruzi e IFN<math>\gamma</math>.....</i>	<i>89</i>

Figura 18: LIB estimulados in vitro indujeron la secreción de TNF y de IFN $\gamma$  por células NoB, y no presentaron el mismo perfil de moléculas de superficie que CP generadas in vivo con la infección con *T. cruzi* ..... 92

# ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

---

**Ac(s):** Anticuerpo(s)

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADO:** Adenosina

**Ag(s):** Antígeno(s)

**AgTpY:** Antígenos de tripomastigotes cepa Y

**AMP:** adenosina 5'-monofosfato

**AR:** Artritis Reumatoidea

**ATP:** Adenosina trifosfato

**Bcl-2:** del inglés: B-cell lymphoma 2

**Bcl-xL:** del inglés: B-cell lymphoma-extra large

**BCR:** Receptor del linfocito B, del inglés: B cell receptor

**Blimp1:** Del inglés: B lymphocyte-induced maturation protein-1.

**Bregs:** Linfocitos B regulatorios

**CD:** clúster de diferenciación

**CDs:** células dendríticas

**CG:** centro germinal

**CI:** control de isotipo

**CIITA:** transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, del inglés: class II, major histocompatibility complex, transactivator

**CMS:** Célula Mieloide Supresora

**CMVM:** Citomegalovirus Murino

**CP:** células plasmáticas

**CPA:** Célula presentadora de antígenos

**CpG:** Citosina trifosfato seguida de guanina trifosfato

**CpG-ODN:** Oligodeoxinucleótidos de citosina trifosfato seguida de guanina trifosfato

**CTLA4:** del inglés: cytotoxic T-lymphocyte antigen 4.

**EAE:** Encefalomiелitis Alérgica Experimental

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético.

**EF:** extrafolicular

**ELISA:** enzimoimmunoanálisis, del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

**EM:** Esclerosis Múltiple

**ERK1/2:** Del inglés: extracellular-signal-regulated kinases

**FAS:** Receptor de superficie que media muerte por apoptosis, CD95

**FASL:** Ligando para el receptor FAS

**FMO:** Control de Fluorescencia Menos Uno, del inglés: Fluorescence Minus One

**GCSF:** Factor Estimulante de Colonias Granulocíticas, del inglés Granulocyte colony stimulating factor

**GITR:** del inglés, glucocorticoid-induced TNFR family related gene

**GrB:** Granzima B

**h:** Horas

**IFNAR1:** Receptor alfa para Interferones tipo I, del inglés: Interferon-alpha/beta receptor alpha chain

**IFN $\beta$ :** interferón de tipo I, beta

**IFN $\gamma$ :** interferón gamma

**IFM:** Intensidad de Fluorescencia Media

**Ig(s):** inmunoglobulina(s)

**IL:** interleuquina

**iNOS:** Óxido-Nítrico Sintasa inducible, del inglés: inducible Nitric Oxide Synthase

**ip:** intraperitoneal

**KO:** deficiente genéticamente, del inglés knock-out

**LES:** Lupus Eritematoso Sistémico

**Li:** linfocito/s

**Li $\gamma\delta$ :** Linfocito T gamma delta

**LPS:** Lipopolisacárido

**MHCII:** Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II, del inglés: Mayor Hiscompatibility Complex II

**min:** Minutos

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

**NK:** del inglés: Natural Killer

**NKT:** del inglés: Natural Killer T cell

**NOS2:** óxido nítrico sintasa inducible, del inglés: inducible nitric oxide synthase

**NOX2:** NADPH Oxidasa 2

**ON:** óxido nítrico

**PALS:** mango linfoide periarteriolar, del inglés: periarteriolar lymphoid sheaths

**PD1:** del inglés: Programmed cell death protein 1

**PDL1:** Ligando 1 para el receptor PD1

**PDL2:** Ligando 2 para el receptor PD1

**pi:** post-infección

**PL/CP: Plasmoblastos o Células Plasmáticas**

**SBF:** Suero Bovino Fetal

**SNAP:** S-nitroso-acetil-penicilamina

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**STAT:** transductor de señal y activador de la transcripción, del inglés: signal transducers and activators of transcription

**T-bet:** del inglés: T-box transcription factor TBX21.

**Tfh:** T cooperadoras foliculares, del inglés T follicular helper

**TGFβ:** factor de crecimiento transformante beta, del inglés: Transforming growth factor beta

**Th:** T cooperadoras, del inglés T helper

**TIM1:** Del inglés: T cell Ig domain and mucin domain Protein 1

**TLR:** receptores de tipo Toll, del inglés Toll like receptors

**TNF:** factor de necrosis tumoral, del inglés tumor necrosis factor

**Tregs:** Linfocitos T regulatorios

**TRIF:** del inglés: TIR-domain-containing adapter-inducing interferonβ

**VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana

**WT:** del inglés: Wild Type; en esta tesis ratones C57BL/6

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, afecta a 8 millones de personas e impone una importante carga económica debido a la mortalidad temprana y discapacidad física. Es endémica en América Latina, pero se convirtió en un problema de salud pública mundial por la migración de las personas infectadas. La progresión de la enfermedad, desde asintomática a grave, está vinculada a la heterogeneidad de las distintas cepas del parásito existentes y a una variable respuesta inmune del hospedador infectado. Se ha informado que la persistencia del parásito, así como la intensidad de la respuesta inflamatoria son determinantes de las manifestaciones clínicas de la enfermedad [1, 2]. A pesar de que la inflamación es indispensable para la defensa del huésped [3-14], cuando está desregulada puede contribuir a lesiones tisulares y disfunción orgánica [15-19]. En consecuencia, la identificación de la naturaleza de las células y moléculas capaces de mantener la integridad del hospedador, así como la replicación del patógeno, es crucial para la comprensión de la patogénesis de la enfermedad de Chagas y también para el diseño de nuevos enfoques terapéuticos. La fase aguda de la enfermedad de Chagas en ratones y seres humanos se caracteriza por un estado de inmunosupresión en el que *T. cruzi* se replica extensivamente e induce moléculas inmunomoduladoras que retrasan las respuestas de linfocitos (Li) T específicos del parásito. Este estado de las células T coexiste con la activación policlonal de LiB, lo que sugiere que los LiB pueden influir en la función de LiT y viceversa.

Durante la infección por *T. cruzi*, se ha establecido que los LiB tienen un rol protector fundamental [20], y se ha descrito que los anticuerpos (Acs), los cuales son producto de estas células, pueden ejercer funciones tanto protectoras [21-23] como deletéreas (Acs auto-reactivos) [24, 25]. Sin embargo, no se han descrito en profundidad mecanismos ejercidos por los LiB independientes de su capacidad para producir Acs. Últimamente, en diversos modelos experimentales, se han reportado funciones regulatorias tanto para los LiB [26] como para LiB que expresan CD138 y que corresponden a estadios de diferenciación, denominados plasmoblastos y/o células plasmáticas (PL/CP), siendo las células plasmáticas (CP) el estadio de diferenciación terminal [27-30]. La mayoría de los mecanismos regulatorios, ejercidos por las células mencionadas, involucran la secreción de citoquinas [28-31]. Sin embargo, queda por esclarecer el posible papel regulador desempeñado por los LiB y los PL/CP via moléculas inhibitorias expresadas en la superficie celular. Es por ello que el objetivo de este trabajo de tesis fue: **Evaluar la función regulatoria de los LiB y de su producto de diferenciación, los PL/CP, sobre la respuesta**

**inflamatoria disparada en la infección con *T. cruzi* y tratar de identificar alguno de los mediadores involucrados.**

Para ello, utilizamos un modelo de infección en ratones ya descrito y en curso en nuestro laboratorio, que consiste en la infección de ratones C57BL/6 (controles, del Inglés: WT) con tripomastigotes del *T. cruzi* cepa Y-br. Para llevar a cabo nuestro objetivo empleamos además ratones muMT, los cuales son ratones modificados genéticamente deficientes en LiB maduros. Observamos que los ratones muMT infectados presentan una prematura mortalidad pero son capaces de controlar la replicación del *T. cruzi*. Los ratones muMT infectados presentaron un aumento significativo en la concentración plasmática de IFN $\gamma$  y TNF, en comparación a ratones WT infectados; sugiriendo que en ausencia de LiB la infección dispara una exacerbada respuesta inmune pro-inflamatoria. En particular, los ratones muMT infectados presentaron alteraciones clínicas y bioquímicas asociadas a elevados niveles de TNF en suero, y una correlación entre la concentración de TNF y su mortalidad. El bloqueo de TNF promovió una recuperación inicial en el peso corporal de los ratones muMT infectados tratados, pero a tiempos tardíos los ratones murieron por exacerbación de la respuesta pro-inflamatoria. En correlación con los incrementados valores de TNF en plasma, los ratones muMT infectados presentaron un mayor porcentaje y número relativo de células productoras de TNF en bazo y ganglios linfáticos. En particular, la composición de la población secretora de TNF de los ratones muMT infectados con respecto a ratones WT infectados fue diferente; contenía un mayor porcentaje de LiT CD4<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>, LiT CD8<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> y de células con fenotipo de neutrófilo Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>. A su vez, siendo los LiT CD4<sup>+</sup> la mayoría de las células productoras de TNF en ambas cepas de ratones, los LiT CD4<sup>+</sup> de ratones muMT infectados presentaron un perfil pro-inflamatorio más exacerbado que sus análogos en ratones WT infectados, y la transferencia de LiT CD4<sup>+</sup> de ratones muMT infectados a ratones WT infectados alteró el perfil de los LiT CD4<sup>+</sup> en los ratones receptores y aumentó la secreción de IFN $\gamma$  sistémico.

Debido a que las alteraciones presentes en los ratones muMT infectados se producen en ausencia de los LiB, evaluamos los cambios fenotípicos y funcionales que sufre esta población celular durante la infección en los ratones WT, para así poder identificar a las poblaciones regulatorias B. Observamos que los Li B sufrieron una expansión inicial y posterior contracción tanto en bazo como en ganglios linfáticos, y que se generaron LiB de centro germinal (CG) y CP. Evaluando posibles mediadores regulatorios, observamos que durante la infección con *T. cruzi* los LiB y CP produjeron las citoquinas IL10, TGF $\beta$  e IL6 y expresaron significativamente el Ligando 1 para el receptor PDI (PDL1).

Por medio de ensayos de eliminación de LiB y PL/CP, dentro de las células esplénicas de ratones infectados, evidenciamos que los LiB son capaces de regular negativamente, *in vitro*, a células secretantes de TNF a través de un mecanismo dependiente de contacto celular y que dicha función se abolió con el bloqueo de PDL1. Con el mismo tipo de ensayos evidenciamos que los PL/CP generadas durante la infección también son capaces de regular negativamente a células secretantes de TNF e  $IFN\gamma$  *in vitro* presentes en esplenocitos de ratones WT infectados.

Al caracterizar en mayor profundidad a las CP de los ratones infectados con *T. cruzi*, determinamos que las CP se ubican en focos extrafoliculares (EF), expresan CD11c, PDL1 y otros receptores asociados a funciones supresoras como PDL2 y CD39. Demostramos que PDL1 se induce en los LiB a través de estímulos como ligandos de Toll, tripomastigotes de *T. cruzi* e  $IFN\gamma$ , y que CP generadas *in vitro*, al igual a lo determinado *in vivo*, presentaron mayor expresión de PDL1 que LiB activados. En base a este dato decidimos expandir, *in vitro*, a los LiB PDL1<sup>+</sup> para poder evaluar la función supresora de éstas células. Contrariamente a lo esperado, observamos que LiB activados con ligandos de TLR, o parásitos e  $IFN\gamma$  o combinaciones de ellos y que expresan PDL1 indujeron la secreción de TNF y de  $IFN\gamma$  por células esplénicas sin LiB (NoB) de ratones infectados. En estas condiciones experimentales los LiB parecían tener más una función presentadora de antígenos (Ag) que una función regulatoria.

Para poder comprender este último resultado evaluamos el perfil fenotípico de los LiB y de las CP de los ratones infectados con *T. cruzi* y los comparamos con el perfil de los LiB activados *in vitro* con los estímulos arriba mencionados. Observamos que las CP de los ratones infectados con *T. cruzi* expresaron menos niveles de CD80 y MHCII, y mayores niveles de PDL1 y CD39 que LiB estimulados *in vitro*. Los resultados indican que los LiB y CP de los ratones infectados que ejercen una función regulatoria tienen un fenotipo particular que no es expresado por sus equivalentes obtenidos *in vitro* y que el solo aumento de la expresión de PDL1 en LiB o CP no garantiza una función regulatoria.

En conclusión general, en la presente tesis doctoral, determinamos que las CP generadas en la infección con *T. cruzi* son capaces de ejercer funciones adicionales a las de secretar Acs, como es la de ejercer una función regulatoria de células secretantes de TNF e  $IFN\gamma$ , a través de la expresión de PDL1.

**Palabras Clave:** *Trypanosoma cruzi*, Enfermedad de Chagas, Linfocitos B regulatorios, Células Plasmáticas regulatorias.

**INTRODUCCIÓN**

**1**



## 1.1] Enfermedad de Chagas: Generalidades

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, es una enfermedad tropical que afecta cerca de 8 millones de personas y se distribuye principalmente en América latina, siendo Argentina una de sus zonas endémicas. En los últimos años, los casos de infección por transfusiones de sangre y trasplantes de órganos han adquirido relevancia en áreas no-endémicas debido a la migración poblacional desde áreas endémicas. Además, esta infección ha sido identificada como re-emergente después de estados de inmunosupresión, transitorios o permanentes, ocasionados por drogas inmunosupresoras o por la infección con Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) [24, 32].

La enfermedad se manifiesta con 3 estadios: agudo, indeterminado y crónico. El periodo agudo cursa con tripomastigotes (forma flagelada e infectante del parásito) circulantes en sangre y con disturbios inmunológicos variables. Es sintomática sólo en el 1% de los casos, en los que se presenta con fiebre, fatiga, inflamación del sitio de infección y ganglios linfáticos indurados. En general, el episodio agudo se resuelve espontáneamente en dos meses y es seguido por una fase denominada "indeterminada", silente, caracterizada por la ausencia de parásitos circulantes. Prosigue a esta etapa la fase crónica, caracterizada por la presencia de parásitos en diferentes órganos tales como corazón, esófago, colon y/o sistema nervioso central (SNC) y periférico. En aproximadamente un tercio de los individuos infectados, el estadio crónico se presenta con alteraciones cardíacas (agrandamiento de corazón, miocardiopatía inflamatoria fibrosante que lleva a una insuficiencia cardíaca progresiva, de curso fatal) o digestivas (megacolon o megaesófago) clínicamente definidas o afecciones del SNC como meningoencefalitis [33-36]. La cardiopatía chagásica crónica es la forma más prevalente de la enfermedad de Chagas crónica [37] mientras que las manifestaciones digestivas son la segunda causa de mortalidad ocasionada por esta patología [38]. Los "mega" aparatos digestivos comienzan como una incoordinación motora (aperistalsis) debido al compromiso del sistema nervioso autónomo (plexos mioentéricos). Aunque las lesiones neuronales afectan el plexo mioentérico en varias partes del tubo digestivo, las mayores repercusiones ocurren en el esófago y colon, dado que en estas porciones del sistema digestivo el contenido generalmente es sólido y, por lo tanto, más dependiente de las fuerzas peristálticas. Las lesiones dentro del sistema nervioso periférico permiten el desarrollo de la cardiomiopatía y mega-digestivos chagásicos [39].

En la actualidad existe consenso en que la persistencia parasitaria sumada a un desequilibrio en la respuesta inmunológica dan lugar a una respuesta inflamatoria sostenida que es responsable de las lesiones tisulares características de la etapa crónica de la infección con *T. cruzi* [1, 2]. El microambiente inflamatorio que se genera en respuesta a la infección es favorable para la activación inespecífica de LiB y T auto-reactivos, que normalmente son tolerantes a Ags propios [40] y de Li no-específicos para el parásito. En este sentido, Acs no específicos para el parásito y/o auto-reactivos contra endocardio y nervios han sido involucrados en el desarrollo de la patología chagásica [41-43].

## **1.2] Modelos Experimentales**

A lo largo del siglo XX se han publicado numerosos trabajos describiendo la infección aguda y crónica con el *T. cruzi* en distintas especies animales, en los que se ha intentado de alguna manera reproducir los aspectos más destacados de la clínica y de la inmunología de la enfermedad de Chagas. Los requisitos que deben ser tenidos en cuenta para que un modelo experimental sea válido, para que la información obtenida pueda ser aplicada a la situación humana, han sido enunciados en 1984 por la Organización Mundial de la Salud (WHO 1984): "Idealmente un modelo apropiado de la enfermedad de Chagas debería reproducir las lesiones histopatológicas y manifestaciones clínicas similares a las observadas en humanos, incluyendo las típicas alteraciones electrocardiográficas asociadas con la enfermedad. A semejanza de lo que ocurre con la infección humana crónica, también deberá ser posible detectar una parasitemia baja persistente y una sero-reactividad continuada a Ags parasitarios".

Hasta el momento, se puede afirmar que si bien ninguna infección experimental en ningún animal de laboratorio reproduce totalmente la enfermedad humana, ha sido posible inducir en animales de experimentación infección crónica con reproducción de alguna de las lesiones y signos clínicos observados en humanos. Los ensayos más relevantes se han llevado a cabo en ratón, perro, mono, cobayo, rata y conejo. El ratón es la especie que ha sido más empleada para el estudio de la infección aguda y crónica de la enfermedad de Chagas en razón del bajo costo, de la existencia de cepas endocriadas y de que es la especie mejor estudiada desde el punto de vista inmunológico. El curso de la infección aguda varía de acuerdo con la cepa del parásito empleada, la cepa del ratón, la edad y el sexo de los animales en el momento de la infección, el número de parásitos inoculados y la vía de inoculación. En líneas generales, se puede afirmar que las cepas más patógenas producen una enfermedad aguda de elevada mortalidad que llega al 100% en cepas de animales susceptibles, con elevada parasitemia y presencia de nichos de amastigotes (forma intracelular replicativa aflagelada del parásito) en los macrófagos esplénicos, hepáticos y

del tejido adiposo, en los miocitos esqueléticos, cardíacos y lisos, en las neuronas y en la neuroglia (Andrade 1979).

Si bien la infección aguda con cepas patógenas del *T. cruzi* brinda poca información acerca de la situación humana, puesto que en el humano inmuno-competente la etapa aguda de la infección es generalmente asintomática o con recuperación espontánea, los modelos experimentales son de utilidad para la búsqueda de drogas tripanocidas [44] y para estudiar alteraciones inmunológicas en el hospedador infectado [45-48].

### **1.3] Respuesta Inmune frente a la infección con el *T. cruzi***

El sistema inmune es crítico en la progresión de la enfermedad de Chagas, no sólo en el control de la infección sino también en el desarrollo de la patología chagásica. En base a una gran variedad de estudios publicados en modelos experimentales [49-51], se ha podido demostrar que para un correcto control de la infección por *T. cruzi*, es necesaria una respuesta pro-inflamatoria de tipo 1. La acción combinada de diversas células, incluyendo macrófagos, células dendríticas (CDs), LiT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, células Natural Killer (NK), y LiT de tipo NK (NKT), genera este tipo de respuesta y asegura el control de la parasitemia observada en la infección aguda y una ausencia de recidivas posteriores. Sin embargo, también se ha reportado que este tipo de respuesta también podría estar implicado en la patogenia de la enfermedad, en caso de una deficiencia en mecanismos regulatorios adecuados ejercidos por el sistema inmune [52].

#### **1.3.1] Respuesta pro-inflamatoria de tipo 1: Mecanismos de Protección contra el *T. cruzi***

En la infección por *T. cruzi*, células de la respuesta inmune innata juegan un rol importante en el control de la replicación parasitaria y de la diseminación del parásito en los tejidos durante la fase aguda de la infección. Los macrófagos y CDs son células blanco para el *T. cruzi*; el parásito puede infectarlas y replicarse dentro de ellas. Estas células son capaces de reconocer y de interaccionar con el *T. cruzi* por medio de diversos receptores innatos. Los estudios se han profundizado principalmente en los receptores tipo Toll (TLR por sus siglas en Inglés Toll-like receptors). De acuerdo a estudios *in vivo*, se sabe que los receptores TLR2, TLR4, TLR7 y TLR9 son de vital importancia para disparar mecanismos que controlan la infección, ya que animales deficientes genéticamente, KO (del inglés "knock out") en estos receptores, presentan una incrementada parasitemia y elevada mortalidad [53-56]. Lógicamente, así como la ausencia de los receptores aumentan la susceptibilidad a esta infección, la ausencia de MyD88 (del inglés, myeloid differentiation primary response 88), una de las proteínas involucrada en la vía de señalización de estos

receptores, también lo hace [53]. Diversas estructuras del *T. cruzi* actúan como ligandos para los TLR. Por ejemplo, se sabe que glicoproteínas tipo mucina ancladas a glicosilfosfatidilinositol, presentes en la membrana del parásito y la proteína secretada por el *T. cruzi* Tc52, actúan como ligandos de TLR2, y motivos CpG presentes en el ADN parasitario actúan como ligandos de TLR9 [51]. Los estímulos dados a través de los TLR, así como otros estímulos intracelulares desencadenados por el metabolismo del parásito, conllevan a la activación de las vías de señalización de TRIF (del inglés, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon $\beta$ ) y MyD88, promoviendo la secreción de citoquinas como IFN $\beta$  y de IL12 y TNF, respectivamente [51].

El IFN $\beta$  secretado actuaría autócrinamente, vía el receptor IFNARI (Receptor alfa para Interferones tipo I), promoviendo la transcripción y producción de las p47-GTPasas IRG47 y LRG47, que en conjunto están involucradas en la eliminación del parásito. En concordancia, macrófagos y CDs provenientes de ratones LRG47KO son más susceptibles a la infección, y presentan una disminución en su capacidad para inducir la muerte del *T. cruzi* intracelular [57].

La secreción de IL12 induce la activación de células NK, las cuales son capaces de matar directamente a los tripomastigotes por un mecanismo dependiente de contacto [58] y también por secretar IFN $\gamma$  [3-5], citoquina clave en el control de la replicación del parásito. Las células NK de ratones deficientes en el receptor de interferones tipo I (IFNARIKO) infectados presentan una deficiente actividad citotóxica, por lo cual los interferones de tipo I también estarían involucrados en la activación completa de estas células [4]. Modelos experimentales en donde se eliminan células NK, durante la infección con *T. cruzi*, revelan un rol clave de esta población para la respuesta contra el parásito, ya que su depleción desencadena un aumento en la parasitemia y elevada mortalidad [6]. Además, la secreción de IL12 por macrófagos y CDs promueve la diferenciación de LiT hacia un perfil Th1 (T cooperador, del Inglés T helper; de tipo 1) secretor de IFN $\gamma$ , IL2 y TNF. Ha sido demostrado que tanto los LiT CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> son necesarios para la resistencia contra el *T. cruzi* [6-8], y en particular aquellos con perfil Th1, diferenciados a través de la vía de señalización que involucra STAT4. Se ha reportado que los ratones STAT4KO son susceptibles a la infección, presentando mayor mortalidad y elevada parasitemia [9]. Por otra parte se ha reportado que los Li Th2 (con perfil cooperador tipo 2), diferenciados vía STAT6, no estarían involucrados en los mecanismos de resistencia [9].

El IFN $\gamma$  secretado tempranamente por células NK y más tardíamente por LiT, junto con el TNF secretado por macrófagos y LiT, [3, 10-12] inducen la expresión de la enzima Óxido-Nítrico Sintasa inducible (iNOS), siendo el óxido nítrico (ON) su producto con

propiedades tripanocidas. Se ha descrito que la dadora de ON, la S-nitroso-acetilpenicilamina (SNAP), es capaz de matar tripomastigotes *in vitro* en ausencia de células del hospedador, indicando que el ON media directamente la muerte del *T. cruzi* [59]. Citoquinas de tipo supresor o asociadas a un perfil Th2, tales como IL10, TGF $\beta$ , IL4, e IL13 han sido descritas como inhibidoras de la inducción de iNOS [60, 61]. El ON, a pesar de tener un rol clave durante la etapa aguda, no jugaría un papel importante en etapas posteriores de la infección, ya que la administración de un inhibidor de iNOS en ratones infectados que cursan una etapa aguda tardía o crónica de la infección no provocó la reaparición de la parasitemia ni mayor mortalidad [62]. La vía de IL12-IFN $\gamma$ -TNF-iNOS es clave para el control de la infección aguda con *T. cruzi*, ya que modelos experimentales en ratones deficientes en (o en donde se bloquea la vía con Ac monoclonales) alguna de las citoquinas, algún factor de sus vías de señalización, o iNOS, al ser infectados con *T. cruzi* presentan elevada mortalidad con alta parasitemia y parasitismo con respecto a sus correspondientes controles WT [10, 11, 13, 14, 63].

Otro mecanismo tripanocida tiene como mediadores a las especies reactivas del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno, generado a través de la enzima NADPH Oxidasa (NOX2). Dhiman y colaboradores [64] reportaron que ratones deficientes en NOX2 (p47phoxKO) activa presentan una mayor mortalidad y parasitismo tisular que ratones WT infectados con *T. cruzi*. Los autores demuestran que a pesar de la deficiencia enzimática, los macrófagos de los ratones p47phoxKO compensan su actividad tripanocida con la expresión de iNOS y generación de ON [65], pero difieren en la secreción de citoquinas en cuanto a que secretan predominantemente IL10 mientras que los macrófagos WT secretaban TNF. Describieron además, que los LiT CD8<sup>+</sup> de los ratones p47phoxKO infectados no son capaces de proliferar de manera específica [64], sugiriendo un papel para la NOX2 en la presentación antigénica [66, 67].

Además, por otra parte, se observó que la IL17A influencia la resistencia del hospedador a la infección con *T. cruzi*, ya que el tratamiento de ratones infectados con un Ac anti-IL17A, con el fin de anular la actividad biológica de la citoquina, conlleva a una mayor miocarditis, mortalidad prematura y disminución en la carga parasitaria en el corazón. Se determinó que IL17 impide la diferenciación de LiT a Th1, la producción de citoquinas y quemoquinas, y regula el infiltrado de células inflamatorias en el tejido cardíaco [68]. En otro trabajo se mostró que ratones IL17AKO infectados con *T. cruzi* presentan menor supervivencia, presentando falla orgánica sistémica y parasitemia sostenida en comparación a ratones WT, indicando que la IL17A es importante para la activación leucocitaria y la eliminación de los parásitos [69].

Finalmente, ha sido documentado que el desarrollo de una respuesta de LiT CD8<sup>+</sup> específicos es indispensable para el control del *T. cruzi* [70]. La respuesta de los LiT en la infección con *T. cruzi* en ratones C57BL/6 está dominada por células específicas para péptidos, codificados por genes de la familia de transialidasa, tales como el TSKB20 [71]. LiT CD8<sup>+</sup> específicos para este epítipo fueron detectados en sangre, bazo y nódulos linfáticos de ratones con infección crónica. Bustamante y col [72] mostraron que una población de LiT CD8<sup>+</sup> específicos para el *T. cruzi*, con fenotipo de memoria central, es capaz de responder más vigorosamente y aportar una mayor protección frente a un nuevo desafío comparado con LiT efectores.

### **1.3.2] Respuesta pro-inflamatoria de tipo 1: Patogenia**

Con respecto a los mecanismos responsables de la patología de la enfermedad de Chagas, se ha propuesto que el daño tisular en esta enfermedad se debe a una acción directa del parásito sobre los tejidos del hospedador, pero también que es consecuencia de la respuesta inmune del hospedador infectado al reaccionar contra el parásito. La aparente ausencia de parásitos en el corazón de la mayoría de los individuos que sucumbieron a la infección ha conducido a algunos investigadores a proponer una base autoinmune para la patogénesis de la enfermedad [1].

Estudios en humanos sugieren que mientras la forma indeterminada de la enfermedad de Chagas estaría asociada a un predominio de un ambiente anti-inflamatorio (IL10 predominante), la forma cardíaca estaría asociada a un perfil predominantemente pro-inflamatorio (IFN $\gamma$ , TNF, IL6, IL1b) [15, 16]. De acuerdo a esto, la producción de IFN $\gamma$  y de TNF ha sido correlacionada con los signos clínicos de la patología cardíaca. Pacientes con elevados niveles de TNF mostraron peor función cardíaca, determinada por la fracción expulsada por el ventrículo izquierdo, y peor pronóstico para la progresión de la enfermedad [73]. En otro estudio, se clasificó a los pacientes de acuerdo a la secreción de IFN $\gamma$  por células de sangre periférica, y aquellos que presentaban los más altos niveles de IFN $\gamma$ , presentaban además la más grave cardiomiopatía. A su vez, se determinó que las células responsables de la producción de IFN $\gamma$  eran mayoritariamente LiT CD4<sup>+</sup> [74]. Otro estudio demostró que líneas celulares generadas a partir de LiT infiltrantes de corazón, obtenidos de biopsias de pacientes chagásicos durante la etapa cardíaca, producían TNF e IFN $\gamma$  en respuesta a un estímulo policlonal [15]. Análisis de necropsias indicaron que las células que infiltraban corazón en pacientes con patología cardíaca eran LiT CD8<sup>+</sup> y monocitos que secretaban TNF [75, 76]. Por otro lado, en un modelo experimental de patología cardíaca aguda se correlacionó la patología cardíaca y la secreción de citoquinas inflamatorias con la activación de iNOS y expresión de ON [77].

En resumen, la evolución de la enfermedad hacia una forma cardíaca estaría relacionada a la pérdida de la capacidad para controlar la respuesta inmune pro-inflamatoria, desencadenando la destrucción tisular [78].

### **1.3.3] Participación de los linfocitos B en la respuesta inmune frente a la infección con *T. cruzi***

Además de la respuesta innata y del rol de los diferentes tipos de LiT, numerosos estudios indican la importancia de los LiB y de los Acs en la sobrevida del hospedador infectado con *T. cruzi* y en el clearance de los parásitos. El *T. cruzi* contiene una variedad de Ags capaces de estimular respuestas tanto Timo-dependiente como Timo-independiente [79-81]. Inicialmente, luego de la infección con el *T. cruzi* se produce una activación policlonal de LiB. La respuesta de Acs específica para el parásito comienza a establecerse a las 2 semanas post-infección (pi), cuando la parasitemia es alta [82]. La respuesta de Acs anti-parasitaria es máxima a las 4 semanas de infección y permanece en un plateau durante la fase crónica [83]. En la fase aguda de la infección están presentes todos los isotipos de Inmunoglobulinas (Igs) mientras que en la respuesta humoral de la fase crónica predomina IgG2a [83].

La consecuencia de la activación policlonal de LiB es la hipergammaglobulinemia. Los LiB de los animales infectados con *T. cruzi* producen Acs reactivos para Ags parasitarios así como Acs reactivos contra Ags propios y no relacionados. Se ha demostrado que los Acs son responsables de la sobrevida de animales susceptibles en la fase inicial de la infección y del mantenimiento de bajos niveles de parasitemia en la fase crónica [21-23]. Brener [84] propuso que los Acs tripanolíticos producidos durante una infección activa son el principal mecanismo efector capaz de controlar la infección murina y humana con el *T. cruzi*. Entre los Acs antiparasitarios, aquellos que reconocen a cruzipaina (principal cisteína proteasa del *T. cruzi* y altamente inmunogénica) [85, 86] y trans-sialidasa [87, 88] actúan como mediadores de protección. Por otro lado, Acs auto-reactivos como los reactivos con endocardio y nervios han sido reportados en ratones y humanos infectados con *T. cruzi* y se ha propuesto que participan en el daño tisular en la enfermedad de Chagas [24, 25].

En nuestro laboratorio, empleando el modelo de la infección experimental, se observó que ratones Balb/c inyectados con 500 tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Tulahuén) por vía intraperitoneal (ip) presentan una disminución significativa en el número de LiB inmaduros en medula ósea. Esta reducción se debe a que, durante la infección, las células mieloides secretan un producto de la vía de la ciclooxigenasa que conduce a los LiB inmaduros a la apoptosis. De esta manera, el parásito altera la generación de nuevas

progenies de LiB, afectando la respuesta humoral y permitiendo su persistencia en el hospedador infectado [89].

En cuanto a la respuesta que ocurre en órganos linfáticos secundarios, observamos que el *T. cruzi* gatilla una masiva respuesta de LiB tanto de tipo extrafolicular (EF) como de centro germinal (CG). Es conocido que ambas respuestas están condicionadas por la subpoblación de LiB que se activó, la naturaleza del Ag y la afinidad del BCR por su Ag específico [90]. Ambos tipos de respuesta dan lugar a plasmoblastos (estadio previo a CP, que también secreta Acs) y/o CP que difieren en su vida media, localización y en la calidad y cantidad de Acs que secretan. Así, la respuesta EF constituye una ruta de diferenciación más rápida, relativamente menos controlada, que lleva al desarrollo de CP de corta vida que producen Acs de baja afinidad. Por otro lado, la respuesta de CG genera CP que persisten durante largos períodos de tiempo y que secretan Acs de alta afinidad y de un isotipo con mayor especificidad para el patógeno invasor [90]. El mantenimiento de las CP de corta vida parece depender de la existencia de un proceso inflamatorio [91], mientras que las CP de larga vida sobreviven en la médula ósea en condiciones no-inflamatorias. De hecho, las CP de larga vida son quiescentes, persisten en el tiempo y producen Acs aún en ausencia de Ag [92, 93]. En la infección con *T. cruzi* cepa Tulahuén, en ratones Balb/c, los focos EF aparecen muy temprano después de la infección, son evidentes desde el día 3pi y producen IgM. Estos focos EF tienen un pico, en cuanto a cantidad, al día 9pi y se extienden desde la pulpa roja al mango linfoide periarteriolar (PALS), mientras que los CG son observados recién al día 8/9pi [82].

A pesar de la activa proliferación y diferenciación, los LiB de bazo de los animales infectados con *T. cruzi* sufren mayor apoptosis *in vivo* e *in vitro* que los LiB de ratones normales y presentan mayor expresión de Fas y FasL. En los ratones infectados, los LiB que secretan IgG específica para Ag parasitarios sufren muerte celular vía Fas/FasL por fratricidio [94]. El tratamiento de animales infectados con un Ac bloqueante de la vía Fas/FasL incrementa los niveles de LiB y Acs específicos para el parásito, favoreciendo el control de la infección [94]. Analizando señales capaces de regular la sobrevivencia de los LiB, observamos que IL4 rescata de la apoptosis espontánea a los LiB IgM<sup>+</sup> e IgG<sup>+</sup> tanto activados por la infección como en reposo. Los mecanismos involucrados en este rescate no dependen de las proteínas Bcl-2 ó Bcl-xL ni de Fas. En LiB de animales infectados, IL4 disminuye la expresión de FasL e incrementa la expresión de CIITA (transactivador de clase II) [95], quien sería responsable de la represión de FasL, como se ha determinado para otros tipos celulares [96]. Adicionalmente, determinamos que IL4 y anti-CD40 inducen la expresión de Galectina-3 (Gal-3) en LiB en reposo, e incrementan la expresión de la misma en LiB de ratones infectados que, por su estado de activación, ya la expresan.

Mediante inhibición de la Gal-3 endógena con una estrategia antisentido, observamos que Gal-3 es un factor crítico para la represión de Blimp1 (del inglés B lymphocyte-induced maturation protein-1) inducida por IL4, que resulta en el bloqueo de la diferenciación terminal de los LiB y favorece el surgimiento de la población de memoria. Además, la inhibición de esta lectina durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi* favorece el desarrollo de CP resultando en una mayor producción de Igs y en una eliminación más eficaz del parásito [97].

Con respecto a los LiB alojados en cavidad peritoneal, se observó una reducción significativa en el número de LiB1 y B2 peritoneales en animales infectados. Esta disminución se debe a que los LiB se diferencian a CP, regulando negativamente la expresión de marcadores típicos para la identificación de los LiB como CD19 o B220. Las CP, identificadas en peritoneo, generadas por la infección con *T. cruzi* no expresan CD138 (Syndecan-1, marcador típico de CP), tienen niveles bajos de Blimp1 y secretan altas concentraciones de Acs. Las CPs, que se ubican en cavidad peritoneal, secretan grandes concentraciones de Acs en sobrenadantes de sus cultivos, en ausencia de estímulos [98].

Finalmente, se ha reportado que ratones muMT (deficientes en LiB maduros) infectados con la cepa Tulahuén de *T. cruzi* son incapaces de controlar la parasitemia durante la fase aguda de la infección y este defecto fue asociado con una disminución en la producción de IFN $\gamma$  y en el número de LiT CD8<sup>+</sup> [20]. En contraposición, se ha demostrado que ratones Xid, que no poseen LiB1 CD5<sup>+</sup>, son capaces de controlar la parasitemia cuando son infectados con el *T. cruzi* [99]. Estos ratones no presentan los signos de decaimiento observados en ratones WT y tampoco desarrollan patología tempranamente en la fase crónica. La resistencia de estos ratones está asociada con una alta producción de IFN $\gamma$ , la cual es explicada por la ausencia de LiB1 quienes son grandes productores de IL10 [100].

#### **1.4] Regulación de la respuesta inmune en la Enfermedad de Chagas experimental y humana**

La resistencia a la infección con *T. cruzi*, interpretada como la capacidad de sobrevivir a la etapa aguda del proceso infeccioso e iniciar una etapa de infección indeterminada (asintomática), requiere, además de una inmunidad protectora, de una respuesta inmune denominada "regulatoria". Esta respuesta regulatoria, en primer lugar, evita que la respuesta inflamatoria inicial encargada de controlar la replicación parasitaria se desborde generando daño tisular, y en segundo lugar, una vez contenido el parásito, suprime la respuesta pro-inflamatoria que ya no es necesaria. La acción conjunta de ambos

tipos de respuesta (inflamatoria y regulatoria) requiere de un delicado balance, ya que si la respuesta inflamatoria cobra más fuerza, se desencadenarían procesos inflamatorios patológicos, mientras que si cobra más fuerza la respuesta regulatoria no se llevaría a cabo un efectivo control de la replicación del *T. cruzi*. A continuación se describen, a grandes rasgos, mediadores y células que integran la respuesta inmune regulatoria.

#### **1.4.1] Respuesta Regulatoria dependiente de IL10**

IL10 es una de las citoquinas anti-inflamatorias más importante identificada como moduladora de la reacción inflamatoria. Su capacidad supresora ha sido descrita en diferentes modelos experimentales, incluso en la infección con *T. cruzi*. Ha sido reportado que células esplénicas de ratones deficientes en IL10 (IL10KO) infectados con *T. cruzi* producen significativamente mayores niveles de citoquinas pro-inflamatorias (IL12, IFN $\gamma$ , y TNF) y mediadores efectores como ON [14, 17, 18] que ratones WT; demostrando el efecto de IL10 sobre la respuesta de tipo I. En estos ratones se observó, además, una disminución en la parasitemia y en parasitismo tisular [14, 17, 18] lo que se correlacionó con el aumento de la respuesta de tipo I protectora. Sin embargo, se observó que los ratones deficientes en IL10 presentaron mayor mortalidad frente a la infección debido a la patogénesis generada por la respuesta pro-inflamatoria. El trabajo inicial de Hunter y colaboradores [17] demostró que la mortalidad observada en los ratones IL10KO podía ser revertida administrando un Ac anti-IL12 o un Ac anti-CD4, ya que dichos tratamientos condujeron a una disminución en la concentración de IFN $\gamma$  [17]. Este hallazgo le atribuyó un claro rol patogénico a los LiT CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>. Luego, Hölscher y colaboradores [18], profundizaron el estudio y determinaron que la citoquina responsable de la mayor mortalidad observada en ratones deficientes en IL10 era el TNF. Dichos ratones presentaron disminución del peso corporal, hipotermia, hipoglicemia, hiperkalemia, aumento de transaminasas hepáticas, y necrosis hepática junto con coagulación intravascular; estos signos y síntomas, en conjunto, se asemejan al Síndrome por Shock Tóxico, el cual es mediado por niveles sistémicos elevados de TNF. El análisis individual de cada ratón infectado mostró que los ratones próximos a morir presentaban niveles críticamente altos de TNF, correlacionando de esta manera al TNF con mortalidad. Utilizando un antisuero anti-TNF observaron una atenuación en el síndrome clínico y una prolongación de la sobrevida de los ratones IL10KO infectados. A pesar de esto, los ratones murieron luego, presentando nuevamente mayores concentraciones de TNF sistémico (sin cambios en las concentraciones de IL12 ni de IFN $\gamma$ ) [18].

La función regulatoria de LiT productores de IL10 fue revelada también en un estudio comparativo entre dos cepas de ratones infectados con *T. cruzi*; por un lado la cepa

C3H/HeSnJ, la cual se presenta, luego de la infección, con un 100% de mortalidad y parasitismo descontrolado, y por otro la cepa C57BL/6J, con menos del 10% de mortalidad y parasitismo controlado. Se observó que la susceptibilidad de la cepa C3H/HeSnJ a la infección con *T. cruzi* se debe a una deficiente producción de IL10 y a que los ratones presentaban menor infiltrado de LiTCD8<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> en corazón. Experimentos de transferencia celular evidenciaron que los LiT productores de IL10 tienen la capacidad de conferir protección [101].

Con respecto al mecanismo de acción de la IL10, un estudio *in vitro* con cardiomiocitos infectados con *T. cruzi* determinó que IL10 promueve la fosforilación de STAT3 y el incremento del supresor SOCS-3, inhibiendo la translocación de NF-Kb al núcleo celular y la fosforilación de ERK1/2. De esta manera, IL10 reduce la expresión de TNF, IL6, NOS2 y de las metaloproteasas 2 y 9 [102].

Con los experimentos arriba descriptos queda plasmado el papel que juega IL10 en el control de la inflamación generada por el *T. cruzi*. Sin embargo, se ha descripto que es necesario que al comienzo de la infección los niveles de IL10 se encuentren disminuidos para permitir el desarrollo de la respuesta de tipo I protectora. Así, Reed y colaboradores comparando dos cepas de ratones, una susceptible y una resistente a la infección, observaron que la cepa susceptible presenta una aumentada expresión de IL10 desde etapas muy tempranas de la infección, y que bloqueando la actividad de la IL10 se revierte la susceptibilidad a la misma [103]. Por otro lado, Barbosa de Oliveira y colaboradores [104] observaron una mayor mortalidad, con carga parasitaria y parasitemia descontroladas, en ratones infectados que previamente fueron transferidos con LiT, principalmente CD4<sup>+</sup>, secretores de IL4 e IL10 obtenidos de ratones inmunizados con *T. cruzi*.

La función de IL10 también fue evaluada en pacientes chagásicos. Evaluando la etapa clínica en la que se encontraban los pacientes y el perfil de producción de citoquinas, se observó que pacientes chagásicos en etapa indeterminada de la enfermedad presentan mayor expresión de IL10, mientras que pacientes con patología cardíaca presentan un incremento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias [16]. Un análisis similar, en los monocitos de pacientes chagásicos, reveló que aquellos pacientes con patología cardíaca severa tienen monocitos que secretan principalmente TNF, mientras que los pacientes en etapa indeterminada poseen monocitos mayoritariamente secretantes de IL10 [16]. Otros trabajos no encontraron diferencias entre los perfiles de citoquinas de los pacientes chagásicos, pero sí identificaron una correlación positiva entre los niveles de IFN $\gamma$  e IL10 [105] en pacientes en etapa indeterminada y altos niveles de TNF sobre todo en aquellos pacientes con dilatación cardíaca [106].

#### **1.4.2] Participación de IL17 en la respuesta regulatoria**

En la infección con *T. cruzi*, se ha visto que diversas células producen IL17, tales como LiT CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, NKT y LiT-gamma-delta (LiT $\gamma\delta$ ) [69]. Un trabajo profundo, demostró que ratones deficientes en el receptor para IL17 (IL17RA) infectados con *T. cruzi*, presentan mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias como IFN $\gamma$  y TNF, que tienen mayor daño hepático y menor sobrevida. El mecanismo regulatorio descrito indica que la señalización por medio del IL17RA induce la producción de quemoquinas tales como CXCL1 y CXCL2 en bazo e hígado, las cuales serían quimioattractantes para neutrófilos regulatorios productores de IL10 (propios de la activación con *T. cruzi*), que suprimirían la respuesta de IFN $\gamma$  y garantizarían una mayor sobrevida del ratón infectado. Los resultados sugieren que IL17 tiene una participación más bien indirecta, favoreciendo una respuesta regulatoria en infección con *T. cruzi* [19]. En concordancia, se observó utilizando muestras de sangre periférica de pacientes chagásicos, y clasificándolos según la severidad de su patología, que los pacientes con patología cardíaca severa presentan niveles elevados de TNF e IFN $\gamma$  y disminuidos de IL10, y que los pacientes con leve o ausente patología tienen una mayor proporción de LiT CD4<sup>+</sup> IL17<sup>+</sup> [68]. Por otro lado, se observó una correlación positiva entre la mejor función cardíaca que presentan los pacientes chagásicos con la producción de IL17 [107]. En este sentido, el tratamiento con Captopril, una droga antihipertensiva usada en patología cardíaca chagásica con funciones cardioprotectoras, induce un aumento en la expresión de IL17 [108].

#### **1.4.3] Respuesta regulatoria ejercida por Linfocitos T regulatorios**

Los Linfocitos T regulatorios (Tregs) son una subpoblación de LiT CD4<sup>+</sup>, que presentan un epigenoma particular obtenido por señalización vía TCR [109] y que luego incrementan la expresión del Factor de transcripción Foxp3 [110]. En conjunto, su epigenoma y la expresión de Foxp3 les permiten una regulación, tanto positiva como negativa de otros factores de transcripción y moléculas de superficie, a través de los cuales pueden ejercer funciones regulatorias y mantener la homeostasis en el organismo. Los Li Tregs pueden ejercer su accionar a través de:

- La expresión de moléculas de superficie como CD25, LAG-3, CD39 y CD73 y CTLA4
- La secreción de IL10 y TGF $\beta$
- La expresión de moléculas solubles citotóxicas como Granzima B (GrB) [111, 112].

Para dilucidar el rol que cumplen las Tregs en la infección con *T. cruzi* diferentes grupos de investigación utilizaron distintos modelos experimentales. Entre ellos, utilizaron modelos en donde se favoreció el reclutamiento o el incremento en el número de Tregs, así

como modelos de depleción o de inhibición funcional de estas células. Con respecto a los primeros, se observó que el tratamiento con el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (GCSF, por sus siglas en inglés) reduce tanto la carga parasitaria como la severidad de la miocarditis. Después de la administración de GCSF se observó una marcada reducción en los niveles de IFN $\gamma$  y TNF y un incremento en los niveles de IL10 y de TGF $\beta$ . La terapia con GCSF no induce una desviación hacia un perfil Th1 o Th2 pero induce un significativo incremento de Treg en el corazón de los ratones infectados y tratados [113].

Por otro lado, cuando células Tregs obtenidas de ratones inmunizados con la proteína recombinante rSSP4 (proteína que se expresa en las formas amastigotes) del *T. cruzi* fueron transferidas a ratones infectados, las mismas fueron capaces de reducir la inflamación cardíaca y de prolongar la sobrevivencia de los ratones infectados. Sin embargo, la presencia de las Tregs facilitó el incremento de la parasitemia y del parasitismo cardíaco [114].

Los tratamientos con Ac anti-CD25 para eliminar Tregs mostraron resultados controversiales. Un trabajo mostró que el tratamiento *in vivo* con Ac anti-CD25 tanto antes de la infección con una cepa mortal, como antes o durante la infección con una cepa no virulenta del *T. cruzi*, no mejoró ni empeoró el desarrollo de las respuestas inmunes, ya que no encontraron diferencias entre la parasitemia en los ratones infectados, ni en las cinéticas de expansión de los LiT CD8<sup>+</sup> como tampoco en su función efectora. Además, la depleción con anti-CD25 en ratones crónicamente infectados no intensificó las respuestas CD8<sup>+</sup> en músculo. En base a estos resultados, los autores concluyeron que las Tregs aparentemente no jugarían un rol primordial regulando las respuestas CD8<sup>+</sup> [115]. En otro reporte, la depleción con anti-CD25 indujo una menor parasitemia e índices de mortalidad, sin afectar el infiltrado en miocardio ni las proporciones de LiT efectoras o inflamatorias [116]. El tratamiento con anti-CD25 para depletar de células Tregs utilizado por Mariano y colaboradores [117] indujo una mayor mortalidad, pero no indujo ningún impacto en el desarrollo de la miocarditis en ratones infectados con *T. cruzi*. De modo opuesto, Bonney y colaboradores [118] demostraron que la depleción de Tregs con Ac anti-CD25 desencadena una reducción en el parasitismo cardíaco junto con un aumento de la respuesta Th1 al principio de la infección. Esta respuesta fue seguida por una disminución de la respuesta Th1 y un aumento de la respuesta Th17 en la fase tardía de la infección. Este trabajo sugiere que las Tregs regularían las respuestas Th1 y Th17 durante la infección con *T. cruzi*, y entonces serían importantes para modular la respuesta para eliminación del parásito y la inflamación en miocardio [118].

Por otro lado, se describió que el tratamiento con un Ac anti-CD25 que no reduce el número de Treg pero es inhibitorio de su función, indujo un aumento en los mediadores inflamatorios y una disminución en la parasitemia y en la severidad de la enfermedad [119]. La inhibición de las Tregs utilizando un Ac anti-GITR (del inglés, glucocorticoid-induced TNFR family related gene) generó un aumento de células infiltrantes en corazón y de producción de TNF y una reducción en la producción de IL10 y TGF $\beta$ , y aumento del parasitismo en miocardio [117].

Con respecto al rol de las Treg en la infección humana, se ha observado una disminución en la frecuencia de Tregs en niños con la forma indeterminada de la infección, comparados con niños sin infección; mientras que adultos con la forma crónica de la infección presentan elevados niveles de Tregs circulantes en sangre periférica [120, 121]. Otros estudios demostraron que individuos con la forma indeterminada de la infección poseen una incrementada frecuencia de Tregs, mientras que pacientes con la forma cardíaca no presentan aumentos en esta población [122, 123]. Las Tregs de pacientes con forma indeterminada tienen capacidad supresora *in vitro*, producen IL10, IL17 y expresan GrB, a diferencia de las Tregs de pacientes con la forma cardíaca que producen IL6, IFN $\gamma$ , TNF [124]. En conjunto, estos resultados sugieren que durante la infección aguda por *T. cruzi*, las Tregs están disminuidas y permiten la expansión de LiT efectores y cooperadores, y luego incrementan para limitar el daño tisular durante la infección crónica, a través del control de la magnitud de respuestas dañinas. Esta última función permitiría a su vez una persistencia mínima del parásito, ya que limitaría las respuestas específicas en contra del mismo [125].

#### **1.4.4] Participación de las Células Mieloides Supresoras en la regulación de la inmunidad en la infección con *T. cruzi***

Las células mieloides supresoras (CMS) son células de origen mielóide con estado inmaduro, capaces de suprimir respuestas de LiT. También ha sido reportado que son capaces de regular la producción de citoquinas por parte de monocitos. Originalmente fueron encontradas en modelos tumorales, en donde se describió además su capacidad de promover la angiogénesis tumoral, la invasión de células tumorales y metástasis. Las CMSs expresan simultáneamente CD11b y Gr1. Están compuestas por una población de células que expresa marcadores característicos de monocitos (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>Ly6G<sup>low</sup>) y granulocitos (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup>Ly6G<sup>high</sup>). Estas células ejercen su función supresora a través de la expresión de Arginasa, catabolizando aminoácidos esenciales como la L-arginina, dificultando su disponibilidad para LiT. También a través de la expresión de iNOS y por medio de ON, ROS o Peroxinitritos, afectan molecularmente a los LiT. Así, en conjunto,

inhiben la capacidad de respuesta y de proliferación de los LiT. También se ha demostrado que estas células pueden inducir la generación de Tregs [126].

En la infección por *T. cruzi* se ha demostrado la expansión de CMSs por medio del  $IFN\gamma$  producido en la infección, así como su capacidad supresora sobre la proliferación de LiT por medio de la liberación de ON [127]. En un estudio más profundo, se correlacionó la menor inflamación y la mayor supervivencia de ratones Balb/c infectados con un mayor número de CMSs en bazo e hígado, en comparación con ratones C57BL/6 infectados. En dicho reporte, cuando las CMSs fueron eliminadas con 5-fluoruracilo *in vivo* se observó un incremento en la producción de IL6,  $IFN\gamma$  e IL17, y un aumento en la parasitemia y mortalidad de los ratones infectados [128].

#### **1.4.5] Inducción de Respuesta Regulatoria como Mecanismo de Evasión por el *T. cruzi***

Para comprender la importancia de la regulación de la respuesta inmune en la enfermedad de Chagas es importante recordar que la fase aguda de la enfermedad, tanto en ratones como humanos, se caracteriza por un estado de inmunosupresión en el cual el *T. cruzi* se replica extensamente e induce moléculas inmunomoduladoras que retrasan la respuesta de LiT efectores específicos para el parásito [129]. Como agente patógeno, el *T. cruzi* parece haber evolucionado para modular la expresión de moléculas co-estimuladoras en las células presentadoras de Ag (CPA) como una estrategia para sobrevivir en los hospedadores mamíferos [130-132]. Se ha reportado que la infección por *T. cruzi* incrementa la expresión de PD1, uno de los miembros de la familia CD28/CTLA4 con capacidad inhibitoria, en LiT CD8 y CD4 que migran al miocardio durante la fase aguda de esta infección [133]. El entrecruzamiento de PD1 con cualquiera de sus dos ligandos, PDL1 [134] y PDL2 [135], inhibe la activación de LiT y la producción de IL2 y de  $IFN\gamma$ . La inducción en la expresión de PDL1 ha sido demostrado como un mecanismo de evasión inmune por patógenos intracelulares, indicando que la activación de la vía PD1/PDL1 facilitaría el establecimiento de microorganismos [136, 137]. Debido a ello, el bloqueo de las señales PD1/PDL1, en combinación con inmunizaciones terapéuticas o terapias con citoquinas, ha sido propuesto como estrategia para mejorar la eficacia de las vacunaciones [138] y para revitalizar LiT agotados [139]. Durante la infección con *T. cruzi*, el bloqueo de PD1 y de su ligando PDL1 o la "deleción" del gen de PD1 tuvo como consecuencia una reducción en la parasitemia y el parasitismo tisular, pero un incremento en la mortalidad [133]. Estos resultados vinculan a la vía de señalización de PD1 en el control de la miocarditis aguda inducida por *T. cruzi* y proporcionan otra perspectiva de los mecanismos de regulación de la patogénesis de la enfermedad de Chagas.

#### **1.4.6] Inmunosupresión y respuesta de linfocitos B en la infección con *T. cruzi***

En la infección con *T. cruzi*, el estado de inmunosupresión de los LiT observado durante la fase aguda de la infección [140-144] coexiste con una fuerte activación de la respuesta de LiB [46, 47, 145], y esto permitiría suponer un posible impacto de una población sobre la otra. Como mencionamos los LiB se diferencian en CP para aportar, mediante la producción de Acs, protección esencial contra el patógeno extracelular. En los últimos años, se han descrito nuevas funciones para los LiB, que son independientes de la producción de Acs. Así, se ha reportado que los LiB pueden actuar como reguladores positivos o negativos de la inmunidad mediante la secreción de citoquinas o a través de moléculas de superficie con función inhibitoria [26].

### **1.5] Linfocitos B Regulatorios**

Los Linfocitos B regulatorios (Bregs) han sido descritos en la última década. A diferencia del resto de los LiB que cumplen una función efectora a través de la producción de diferentes isotipos de Igs, esta nueva "subpoblación" de Bregs ejercería funciones supresoras de la respuesta inmune. Sus funciones han sido descritas y detalladas en diversos modelos infecciosos, autoinmunes, y tumorales en donde, a grandes rasgos, ya sea a través de la secreción de citoquinas o via la expresión de receptores de superficie, los Bregs son capaces de suprimir procesos inflamatorios efectores (Th1, Th2, Th17).

Los Bregs que han sido descritos hasta el presente presentan diversos fenotipos, por lo cual se desconoce si provienen todos de una misma subpoblación de LiB que modifica su fenotipo al desarrollar su función regulatoria, o si variadas poblaciones de LiB son capaces de generar una subpoblación regulatoria. Es por esto que identificar células B con funciones regulatorias sólo a través del fenotipo celular resulta inadecuado.

A diferencia de las Tregs, las cuales pueden ser identificadas por el factor de transcripción Foxp3, aún no se ha determinado si los Bregs expresan un factor de transcripción en particular. Por lo expuesto se puede inferir que la caracterización e identificación de Bregs en cualquier modelo experimental sólo es posible valorando la población celular a través de ensayos funcionales, que evidencien su capacidad supresora. Los Bregs pueden ejercer su función supresora a través de diferentes mecanismos, los cuales se detallan en los puntos subsiguientes.

#### **1.5.1] Mecanismos Regulatorios: Secreción de IL10**

El mecanismo regulatorio por primera vez descrito para los LiB, y por ello quizás el mayormente estudiado, fue a través de la secreción de IL10. Como previamente se mencionó, la IL10 tiene actividad regulatoria. Células Bregs secretoras de IL10 fueron

inicialmente reportadas en modelos autoinmunes de Colitis [146], Encefalomiелitis alérgica Experimental (EAE) [147] y Artritis Reumatoide (AR) [148]. En el modelo de Colitis se observó que, durante la inflamación de la mucosa intestinal, se favorece el desarrollo de una población de LiB que incrementa la expresión de CD1d y secreción de IL10. Mediante experimentos de transferencia, se demostró que la transferencia de LiB obtenidos de ratones IL10KO no era capaz de inhibir el engrosamiento intestinal observado durante la enfermedad, ni de suprimir la inflamación crónica local; mientras que la transferencia de LiB de ratones WT sí lo lograba. Esto indicaba que la IL10 proveniente de LiB era capaz de regular la inflamación observada durante la colitis experimental [146]. En cuanto al modelo de AR, se demostró que LiB obtenidos de esplenocitos de ratones con esta enfermedad, luego de ser estimulados con anti-CD40 y Ag, producían grandes cantidades de IL10. La transferencia de estos LiB a ratones con AR inducida por colágeno inhibe la diferenciación de LiT CD4<sup>+</sup> a Th1 y previene el desarrollo de la enfermedad. Si estos LiB se transferían en ratones con la enfermedad ya establecida se observa una mejoría en los síntomas. En caso de transferir LiB provenientes de ratones IL10KO, no se observa ningún efecto protector, indicando que la regulación de la respuesta autoinmune patológica esta mediada por la secreción de IL10 [148]. De manera similar, Fillatreau y su grupo [147] describieron por primera vez a los Bregs en un modelo de EAE. Observaron que los LiB de ratones recuperados de EAE, estimulados con auto Ags, producen IL10 y a través de ratones quiméricos, en donde sólo los LiB eran incapaces de producir IL10, demostraron que la recuperación de EAE esta mediada por la IL10 proveniente de los LiB [147]. A este trabajo le siguieron numerosos estudios, entre ellos dos de los cuales tuvieron una gran repercusión, que asociaron una población de Bregs secretora de IL10 al fenotipo CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>high</sup> y fueron denominadas B10 [149]. A su vez, estas células B10 fueron identificadas como las responsables de la regulación de la patología observada en EAE, ya que se observó que cuando se eliminaban LiB con un Ac anti-CD20 antes de inducir EAE en ratones, se exacerbaban los síntomas de la enfermedad. Cuando se transfería la población B10 proveniente de un ratón CD20KO (resultando las células B10 resistentes a la depleción por anti-CD20), previo a la inducción de la enfermedad, se observa una normalización de los síntomas. Esto último se asoció a la regulación negativa del número de LiT CD4<sup>+</sup> Th1 y Th17 que infiltraban SNC [150]. Profundizando los estudios acerca de las B10 se determinó que para su desarrollo y secreción de IL10 es necesario un amplio repertorio del BCR (receptor del LiB), la presencia del receptor CD19 y la señalización vía TLRs y MyD88; no así la presencia de microbiota. Sorprendentemente se encontró que ratones que tienen una predisposición genética a desarrollar procesos autoinmunes presentan un incrementado porcentaje de B10 [151]. En un modelo de Esclerosis Múltiple (EM) se describió que Li B10 necesitan de IL21 y de interacciones a través de CD40 con

LiT para desarrollarse, expandirse y convertirse en B10 efectores secretores de IL10. Estos estímulos *ex vivo* son capaces de inducir la activación y expansión de B10 *in vitro*, que luego son capaces de inhibir síntomas de la enfermedad *in vivo* una vez transferidos [152]. Por último, a partir de un modelo de inducción *in vivo*, mediante inyecciones con Lipopolisacárido (LPS), se identificó que luego de iniciar su transcripción para la producción de IL10, los Li B10 son capaces de incrementar la expresión de factores de transcripción, como Blimp1, asociados a la diferenciación de LiB hacia plasmoblastos/CP y a la capacidad de secretar Acs [153]. Este trabajo demuestra que los LiB pueden ejercer su función regulatoria, y aun así conservar su capacidad para secretar Acs, permitiendo a su vez el clearance de los Ags que inicialmente los activaron [153]. En concordancia, un trabajo publicado por Matsumoto y colaboradores [30] describió que en EAE, plasmoblastos ubicados en los ganglios linfáticos drenantes secretores de IL10 eran capaces de regular los síntomas de la enfermedad. Los autores demostraron que con la transferencia de sólo estos plasmoblastos (no de B10 esplénicas) se podían normalizar los síntomas de EAE [150]. Los datos analizados en conjunto permiten hipotetizar la posibilidad de que Li B10 se diferencien en plasmoblastos/CP y luego se alojen en ganglios drenantes [30].

Con respecto a Li B10 en humanos, estas células se identificaron a través de su capacidad para producir IL10. Se identificaron dos poblaciones potencialmente productoras de IL10: los Li B10 que producen IL10 post-estimulación con PMA/Ionomicina durante 5 horas (h), y los progenitores de B10 (B10pro) que expresan IL10 luego de una estimulación por 48h con LPS+CD40L o CpG+CD40L y PMA/Ionomicina en las últimas 5h. Los linfocitos B10 y B10pro se encuentran principalmente dentro de una subpoblación de LiB con fenotipo CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup>, e *in vitro* son capaces de regular la producción de citoquinas por monocitos. Las poblaciones B10 y B10pro se encuentran aumentadas en individuos con enfermedades autoinmunes [154] tal como sucede en ratones [151]. En otro estudio, se observó que en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) los LiB CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> tienen incapacidad de producir IL10 en respuesta a anti-CD40, mientras que las mismas células de donadores sanos pueden producir IL10 y suprimir respuestas Th1 [155]. Por otra parte, en sangre periférica humana se encontró que individuos con cáncer gástrico tenían incrementados LiB productores de IL10, con fenotipo CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup>, y que estos Bregs a través de la IL10 eran capaces de regular la secreción de IFN $\gamma$  y de TNF por parte de LiT CD4<sup>+</sup> y de fomentar la diferenciación hacia Tregs por medio de TGF $\beta$  *in vitro* [156].

### **1.5.2] Mecanismos Regulatorios de LiB ejercidos a través de la Secreción de citoquinas diferentes a IL10**

La IL10 no es la única citoquina secretada por LiB que ha sido reportada capaz de ejercer una función regulatoria. También se han identificado LiB secretantes de TGF $\beta$  e IL35 con funciones regulatorias. Se ha descrito que LiB, activados con LPS, secretantes de TGF $\beta$  son capaces de inducir apoptosis de LiT CD4 $^+$  [157] y anergia de LiT CD8 $^+$  efectores [158]. En humanos, se ha reportado que LiB secretantes de TGF $\beta$  tienen un rol relevante en la inducción de tolerancia a Ags alimentarios [159]. Por otro lado, Shen y colaboradores [28], describieron Bregs productores de IL35 y ofrecieron un ejemplo claro de cómo los Bregs pueden tener roles protectores o patogénicos a través de la supresión inmune dependiendo del tipo de patología de que se trate, autoinmunidad o infección. Así, en un modelo murino de EAE se hallaron LiB secretantes de IL35 y se demostró su función regulatoria y protectora en esta enfermedad, ya que ratones cuyos LiB tenían una incapacidad de secretar IL35, obtenidos de ratones IL35KO, no podían recuperarse del proceso demielinizante mediado por LiT en la encefalitis. Por otro lado, estas células productoras de IL35 fueron identificadas en un modelo de infección con Salmonella. Para este caso, la incapacidad de producción de IL35 por los LiB aumentó la resistencia para la infección bacteriana, favoreciendo la supervivencia de los ratones infectados. Esto se correlacionó con una mayor activación de macrófagos y LiT inflamatorios, así como con una mayor capacidad de presentación antigénica por parte de LiB. Sorprendentemente, estos Bregs presentaron un fenotipo de plasmoblasto/CP CD138 $^+$ Blimp1 $^+$ , que se ubican en focos EF esplénicos [28]. LiB productores de IL35 con actividad regulatoria también fueron descritos en un modelo autoinmune de Uveítis, en donde IL35 induce Bregs que a su vez producen IL35 e IL10. La transferencia de Bregs inducidos con IL35 mejoró los síntomas de uveítis, debido a la inhibición de Li T CD4 $^+$  Th1 y Th17 (patogénicas) y a la promoción de Tregs [160].

### **1.5.3] Regulación de la inmunidad por LiB a través de Moléculas de Superficie**

Las funciones regulatorias ejercidas por los Bregs no sólo dependen de la secreción de citoquinas; también se han reportado mecanismos supresores dependientes de la expresión de receptores de superficie tales como TIM-1, CD39/CD73 y PDL1.

TIM-1 (del inglés T cell Ig domain and mucin domain Protein 1) es una molécula co-estimuladora que regula respuestas inmunes modulando la diferenciación de LiT CD4 $^+$  a células efectoras. Rothstein [161] y su grupo observaron que TIM-1 está mayoritariamente expresado en LiB, tanto en LiB de transición, como de zona marginal, foliculares e incluso LiB CD5 $^+$ CD1d $^+$ ; y que LiB TIM-1 $^+$  secretan IL10 e IL4 y promueven respuestas de tipo

Th2 y transfieren tolerancia hacia trasplantes *in vivo*. Las Bregs TIM-1<sup>+</sup> pueden ser inducidas a través de la señalización vía TIM-1, lo cual provee información acerca del desarrollo de Bregs, y podría brindar oportunidades para el diseño de terapias [161].

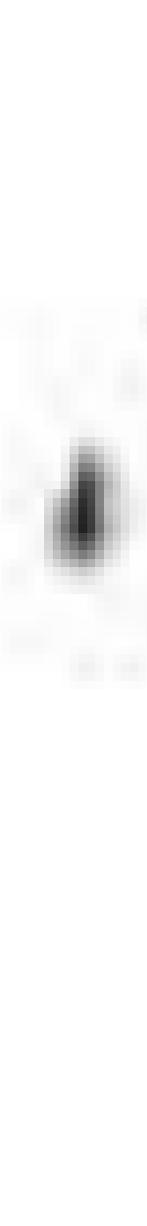
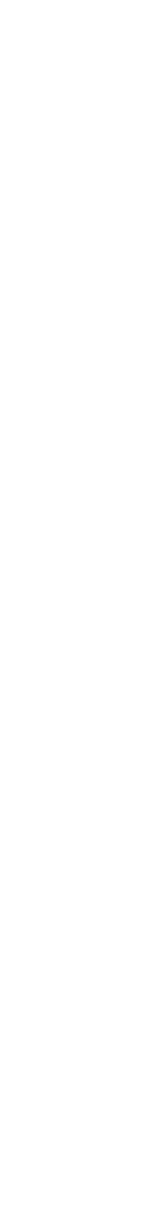
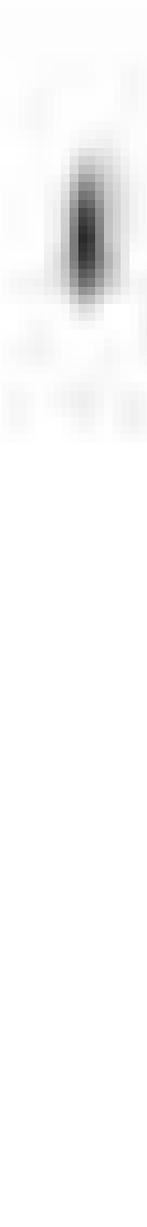
Por otra parte, en un modelo de colitis, inducida por administración de la sal dextran-sulfato de sodio, se evidenció que LiB son capaces de suprimir la respuesta inflamatoria de esta enfermedad a través de la expresión de CD39 y de CD73 [162]. CD39 y CD73 son ectonucleasas que en conjunto son capaces de hidrolizar adenosina trifosfato (ATP) exógena en adenosina 5'-monofosfato (AMP) y finalmente en adenosina (ADO), las cuales son mediadores inmunosupresores [163-165]. La función reguladora de los LiB CD73<sup>+</sup> productores de ADO fue evidenciada cuando la transferencia de los mismos a ratones CD73KO les confirió resistencia a la inducción de colitis [162]. En humanos, los LiB también expresan CD39 e incrementan su expresión luego de ser activados, y los LiB CD39<sup>+</sup> son capaces de suprimir la proliferación de LiT CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> autólogos [166].

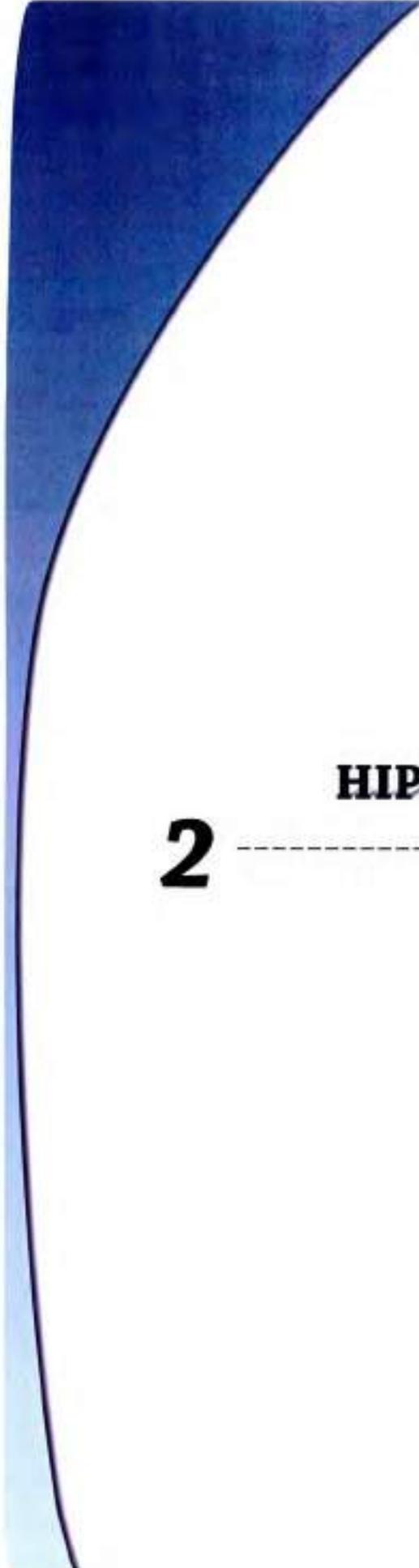
Bregs que ejercen su función a través de PDL1 fueron descriptas en modelos autoinmunes y en cáncer. En un modelo de EAE, la transferencia de LiB PDL1<sup>high</sup> previo a la inducción de la enfermedad demora el inicio de la misma y alivia los síntomas [167]. Esto se correlacionó con una disminución en los porcentajes de LiT CD4<sup>+</sup> cooperadores foliculares (Tfh), una disminución del infiltrado en SNC, y en los niveles de IgG, IFN $\gamma$  e IL17 específicos para la glicoproteína de mielina del oligodendrocito (con la cual se inmuniza para inducir EAE) [167]. Los autores de este trabajo discuten que el mecanismo regulatorio ejercido por los LiB sería independiente de IL10, ya que LiB PDL1<sup>high</sup> casi no producen esta citoquina, y la transferencia de LiB PDL1<sup>high</sup> obtenidos de ratones IL10KO reguló la proporción y el número de Li Tfh cuando los ratones eran inmunizados con hemocianina de lapa californiana [167]. En otro modelo de EAE, en donde el tratamiento con estrógeno E2 tiene una acción protectora, se identificó que los LiB PDL1<sup>+</sup> tienen un rol clave en este mecanismo protector [168]. Por un lado, se reportó que el tratamiento con estrógeno no funciona en ratones muMT, deficientes en LiB, sugiriendo que el mecanismo protector mediado por estrógeno requiere la presencia de LiB [169]. Por otro lado, la protección mediada por estrógeno tampoco tuvo injerencia en ratones PDL1KO ni en ratones muMT transferidos con LiB PDL1KO [168]. Además, se observó que la ausencia de PDL1 provoca una disminución de la población CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>hi</sup> y una disminución de la producción de IL10 por esplenocitos totales [168]. Transfiriendo LiB IL10<sup>+</sup> a ratones PDL1KO [170] se produce una recuperación parcial de la protección mediada por E2 en los síntomas de la EAE. Por otro lado, el tratamiento con estrógeno más la transferencia de LiB IL10<sup>+</sup> mejora los síntomas de EAE en ratones muMT [171]. En conjunto, estos trabajos brindarían información para hipotetizar un posible mecanismo que involucra tanto

a PDL1 como a IL10 en la función regulatoria de los LiB. En concordancia, se demostró que en ausencia de LiB, tumores de próstata en ratón dejan de ser refractarios al tratamiento con Oxaliplatin. En este modelo se pudo evidenciar que la población de Breg está compuesta por plasmocitos que expresaban IgA y ejercen su función regulatoria a través de PDL1 e IL10, suprimiendo la respuesta citotóxica de LiT CD8<sup>+</sup> encargada de erradicar al tumor [172].

#### **1.5.4] Linfocitos B Regulatorios en la Infección con *T. cruzi***

Por último, nuestro laboratorio describió que durante la infección con *T. cruzi*, las principales células productoras de IL17 en bazo son los LiB [31]. De acuerdo al rol regulatorio de la IL17 durante esta infección (descrito previamente por Tosello Boari y col [19]), la transferencia de LiB WT, pero no IL17KO, pudo disminuir la respuesta inflamatoria y mortalidad de ratones deficientes en LiB maduros infectados con *T. cruzi* [31]. Los resultados indican que los LiB de ratones infectados con *T. cruzi* cumplen una función regulatoria de la inmunidad celular a través de la secreción de una citoquina. Cabe destacar, que al igual que las Bregs identificadas por Shen y sus colaboradores [28], parte de los LiB productores de IL17 presentan un fenotipo asociado a plasmoblastos/CP CD138<sup>+</sup>, los cuales se ubican en focos EF esplénicos [31]. El grupo reportó que dichos focos EF, que aparecen muy temprano en la infección, rodean fundamentalmente a LiT [82], lo que permite hipotetizar que los plasmoblastos/CP CD138<sup>+</sup> pueden influir la respuesta inmune mediada por células T.





**2**

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

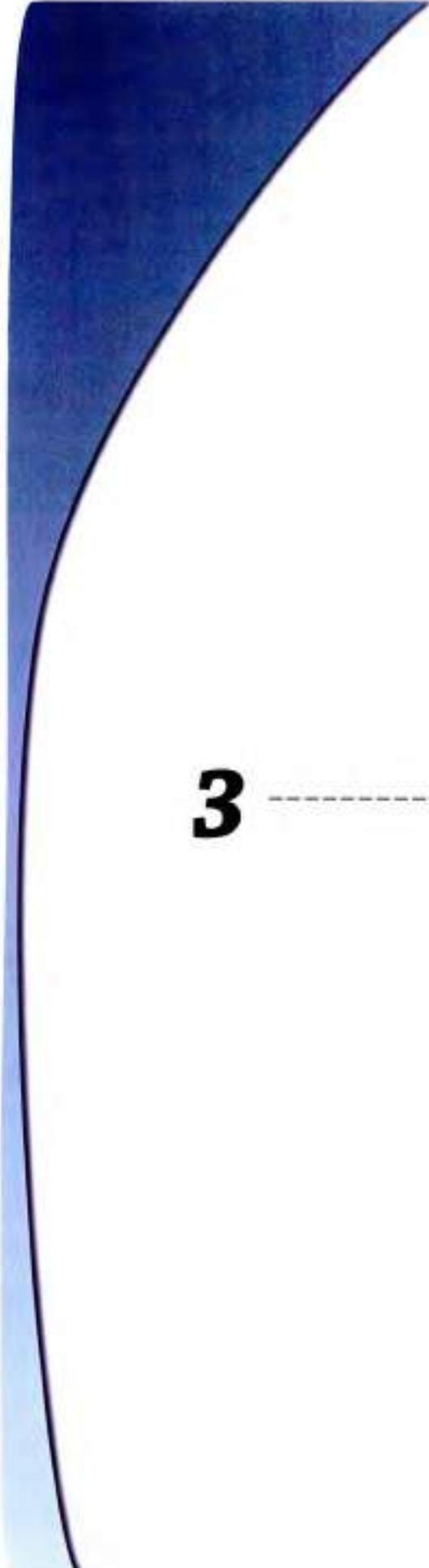
## 2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

El fino equilibrio alcanzado entre los mecanismos efectores y supresores de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa puede asegurar un control efectivo del agente infeccioso en ausencia de efectos deletéreos para el hospedador. Es por ello que la comprensión de las interacciones entre los LiB con células del sistema innato (NK, CD8, neutrófilos, macrófagos) y los LiT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y LiT $\gamma\delta$  y de los mecanismos requeridos para generar una óptima respuesta celular y humoral es esencial para diseñar nuevas vacunas y/o terapias destinadas a controlar infecciones o las patologías derivadas de ellas.

El hecho que los PL/CP de los ratones infectados con *T. cruzi* estén en estrecho contacto con los LiT nos llevó a preguntarnos si este estadio celular, resultado de la diferenciación de LiB, ejerce una función regulatoria. Además nos preguntamos si los LiB o sus productos de diferenciación celular pueden regular la respuesta inmune a través de otras citoquinas diferentes a la IL17 o a través de moléculas de superficie.

En base a esto, el objetivo de ésta tesis doctoral es **“Evaluar la función regulatoria de los LiB y de su producto de diferenciación terminal, las CP, sobre la respuesta inflamatoria disparada en la infección con *T. cruzi*, junto con los posibles mediadores involucrados en la regulación”**.

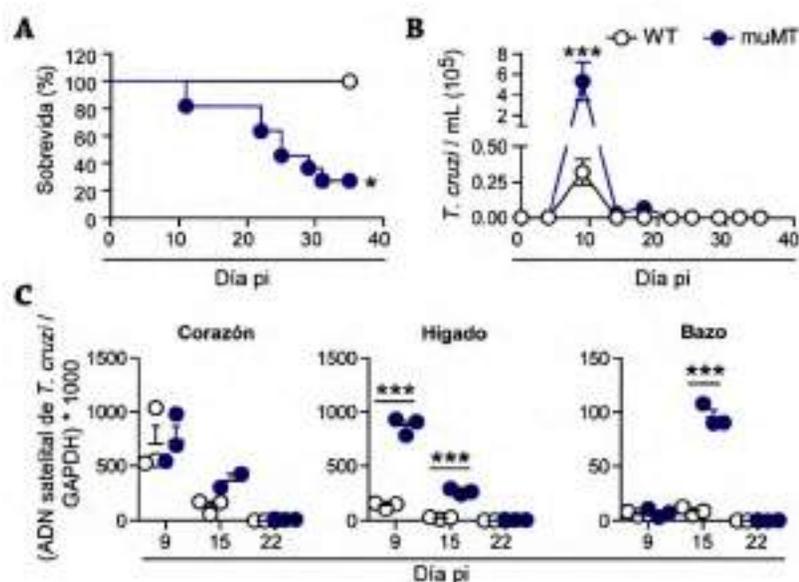


**3**

**RESULTADOS**

### 3.1] Ratones muMT infectados con *T. cruzi* presentan prematura mortalidad y exacerbada respuesta pro-inflamatoria

Para determinar si los LiB cumplen un rol regulatorio en la infección con *T. cruzi*, elegimos como modelo experimental para el desarrollo de esta tesis doctoral la infección en ratones muMT, los cuales son deficientes en LiB maduros. Estos ratones tienen un "background" genético similar al de ratones C57BL/6, por lo que estos últimos fueron utilizados como ratones controles, WT (del inglés wild type). Es importante señalar que más allá del posible rol regulatorio que pudieran estar ejerciendo los LiB, ha sido reportado que los mismos tienen un rol protector en la infección con *T. cruzi* y que los Acs producidos por estas células participan en el control de la replicación y en la eliminación del parásito a través de diversos mecanismos [19, 20, 22, 173-178]. Es por esto, que, en una primera instancia, evaluamos la mortalidad de los ratones muMT infectados en comparación con ratones WT, junto con indicadores propios del desarrollo de la infección, tales como la parasitemia y el parasitismo tisular.



**Figura 1:** Ratones muMT infectados con *T. cruzi* presentaron una prematura mortalidad pero fueron capaces de controlar la replicación del parásito. Ratones C57BL/6 (WT) (n=9) y muMT (n=13) fueron infectados, por vía intraperitoneal, con 10000 tripomastigotes del *T. cruzi* cepa Y-br. A) Porcentaje de sobrevivencia de los ratones infectados a diferentes días pi (\*p<0,05 significativo de acuerdo al test Gehan-Breslow-Wilcoxon). B) Número de tripomastigotes en muestras de sangre a diferentes días pi (\*\*p<0,001 Anova de dos vías con post-test de Bonferroni) C) Carga parasitaria determinada por RT-PCR del ADN satelital de *T. cruzi* de un pool de DNA de ratones infectados (n=5), relativo a GAPDH, a cada día pi por triplicado (\*\*p<0,001 Anova de una vía con post-test de Bonferroni). Se muestra un experimento representativo de 3.

En la Fig. 1 se puede observar que ratones muMT infectados con *T. cruzi* presentaron una mortalidad prematura con respecto a los controles WT infectados (Fig. 1A), ya que la mayoría de los animales deficientes en LiB murieron a partir del día 22pi. Los datos indican, tal como fue reportado [20], que los LiB son necesarios para sobrevivir a la infección por *T. cruzi*.

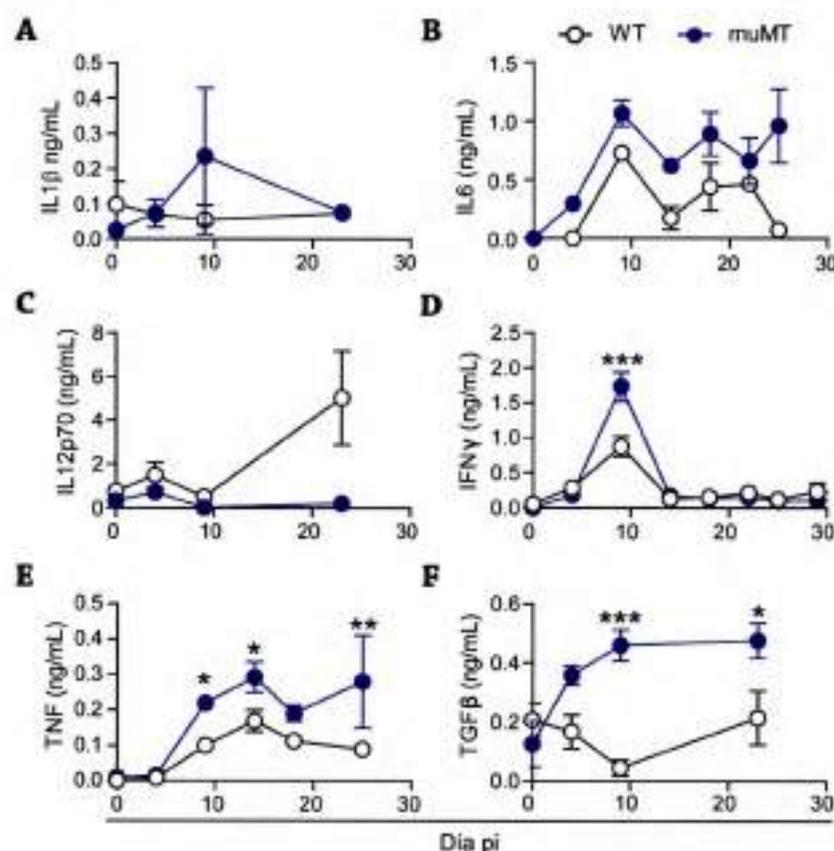
Al estudiar el número de parásitos en sangre circulante observamos que los ratones muMT, a pesar de presentar mayores niveles de parasitemia en el día 9pi (día del pico de parasitemia), posteriormente alcanzaron niveles similares a los detectados en los ratones WT infectados (Fig. 1B). La cinética de la curva de parasitemia fue similar en ambos grupos de animales infectados. A los días 9 y 15pi los ratones muMT infectados presentaron una mayor carga parasitaria en hígado, mientras que en bazo se puede observar una mayor carga parasitaria solo al día 15pi. Para el día 22pi los ratones muMT infectados presentaron cargas parasitarias similares a los controles WT infectados en hígado, bazo y corazón (Fig. 1C). Los resultados analizados en conjunto indican que los ratones deficientes en LiB fueron capaces de controlar la replicación del *T. cruzi* y que un mayor parasitismo tisular no sería la causa de muerte prematura.

Hemos señalado previamente que en la infección con *T. cruzi*, la respuesta pro-inflamatoria es protectora, aunque en niveles elevados puede ser patogénica. Se ha establecido que altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias como IFN $\gamma$  y TNF están asociados con patología chagásica severa y que el balance entre citoquinas anti-inflamatorias e inflamatorias es un determinante clave en la patogénesis de la Enfermedad de Chagas [15, 16, 73]. En base a esta información decidimos analizar los niveles de citoquinas tanto pro- como anti-inflamatorias en los ratones infectados e investigar si la respuesta inmune de los ratones muMT infectados presenta un desvío hacia una respuesta pro-inflamatoria de tipo 1. La concentración de las diferentes citoquinas fue determinada en el plasma de los animales infectados para tener una apreciación de la respuesta del sistema inmune a nivel sistémico.

En la Fig. 2 se muestra que los ratones deficientes en LiB infectados con *T. cruzi*, si bien aparentemente presentaron un aumento en los niveles de IL1b (Fig. 2A) y de IL6 (Fig. 2B) y una disminución en los niveles de IL12 (Fig. 2C), con respecto a los valores obtenidos en ratones WT infectados, estas diferencias no fueron significativas. Observamos que los ratones deficientes en LiB presentaron niveles significativamente elevados de citoquinas que cumplen funciones antagónicas como IFN $\gamma$ , TNF y TGF $\beta$ . La concentración de IFN $\gamma$  presentó un pico en el día del pico de parasitemia (día 9pi) y fue superior en los ratones muMT; posteriormente los valores de esta citoquina disminuyeron

en ambos grupos experimentales alcanzando valores similares (Fig. 2 D). Con respecto al TNF (Fig. 2E), observamos un incremento en la concentración de esta citoquina después del día 5pi en ambos grupos experimentales con un pico máximo de aumento en el día 14pi. Los ratones muMT infectados presentaron mayores concentraciones de TNF en plasma que los ratones WT los días 9 y 14pi. En el día 18pi, las concentraciones de TNF de ambos grupos experimentales se ven reducidas, y mientras permanecen reducidas en el día 25pi en ratones WT, en los ratones muMT infectados se ven nuevamente incrementadas (Fig. 2E). Esto podría deberse a que en el día 18 hay un grupo de ratones muMT infectados que murieron, provocando que la población se modifique, y probablemente seleccionando aquellos que presentan niveles de TNF más bajos a la totalidad del grupo. En otros experimentos donde la totalidad de los animales fueron sacrificados en el día 18pi, el grupo de ratones muMT presentó un aumento significativo en las concentraciones plasmáticas de TNF con respecto a los ratones WT infectados (datos no mostrados). Por otro lado, encontramos que los ratones muMT presentaron a todos los días pi concentraciones de TGF $\beta$  significativamente elevadas (Fig. 2F).

Finalmente, se evaluó la concentración sérica de IL10 y de IL17 en los ratones infectados, y las mismas resultaron indetectables para la técnica de medición utilizada (datos no mostrados).



**Figura 2:** Ratones muMT infectados con *T. cruzi* presentaron un aumento significativo en la concentración plasmática de IFN $\gamma$ , TNF y TGF $\beta$ . Ratones WT (n=9) y muMT (n=13) fueron infectados, por vía intraperitoneal, con 10000 tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y-br. A diferentes días pi se obtuvieron muestras de sangre y se determinó, por ELISA, la concentración de (A) IL1 $\beta$ , (B) IL6, (C) IL12p70, (D) IFN $\gamma$ , (E) TNF y (F) TGF $\beta$  en plasma. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 Anova de dos vías, post-test de Bonferroni.

En resumen, observamos que los ratones deficientes en LiB presentaron aumentos en las concentraciones de las citoquinas pro-inflamatorias en días aislados o durante todo el transcurso de la infección, así como de TGF $\beta$ .

Debido a que el TNF ha sido reportado como mediador de la patología chagásica, y los ratones muMT son incapaces de regular al TNF de la misma manera que ratones WT infectados, decidimos enfocar nuestros estudios en esta citoquina y evaluar su participación en la muerte prematura de los ratones deficientes en LiB. En primer lugar, evaluamos si existía una correlación entre los niveles sistémicos del TNF y la muerte de los ratones infectados. Para ello, nos basamos en los datos de sobrevivencia de los ratones muMT infectados: mientras el mayor porcentaje de los ratones muMT infectados (aproximadamente el 70%) muere frente a la infección (ratones muMT susceptibles), el 30% restante sobrevive (ratones muMT resistentes) (Fig. 1A). Para continuar el estudio infectamos un nuevo grupo de ratones, identificando a cada ratón, para poder hacer un seguimiento individual durante el transcurso de la infección. Para el final del experimento, fuimos capaces de identificar los ratones que habían sobrevivido, aquellos que no, y las muestras tomadas fueron agrupadas de acuerdo a la sobrevivencia. El mismo tipo de identificación fue realizada con el grupo de ratones WT. En la Fig. 3A se muestran las concentraciones de TNF en plasma de cada grupo experimental. Observamos que los ratones muMT resistentes, a pesar de presentar niveles de TNF más altos que ratones WT al día 9pi, fueron capaces de regular negativamente esta citoquina, presentando a posteriori niveles de TNF en plasma similares a los presentados por los ratones WT infectados; mientras que los ratones muMT susceptibles presentaron a los días 14 y 25pi concentraciones de TNF significativamente más altas que las de los ratones WT infectados y que los ratones muMT resistentes (Fig. 3A). Cabe señalar que el número de ratones susceptibles analizados fue disminuyendo con los días pi debido a su muerte y que la misma se asoció con niveles elevados de TNF (datos no mostrados). Es por ello que la población de ratones muMT analizada en el día 18pi es una población particular de ratones sobrevivientes, los cuales presentaron concentraciones plasmáticas de TNF similares al resto de los grupos experimentales.



Teniendo en cuenta los hallazgos de Hölscher y colaboradores [18] los cuales reportan, en ratones infectados con *T. cruzi*, que ciertas manifestaciones clínicas como pérdida de peso, hipotermia, hipoglucemia, hipercalcemia e incremento de enzimas hepáticas junto a daño tisular se asocian con una sobreproducción sistémica de TNF, decidimos evaluar estos parámetros en nuestros grupos de ratones infectados. De acuerdo con los niveles de TNF en plasma, los ratones muMT infectados presentaron una pérdida de su peso corporal a partir del día 9pi (Fig. 3B), la cual continuó hasta la muerte de los animales analizados (día 25pi). La concentración de glucosa en el plasma de los ratones deficientes en LiB infectados fue menor a la de sus correspondientes controles infectados, en todos los días pi analizados (Fig. 3C). Además los ratones muMT infectados presentaron una actividad de la transaminasa GPT significativamente elevada al día 9pi, y elevada, aunque no significativa, previo al día 20pi (Fig. 3D). En correlación con estos datos, en el análisis histopatológico de cortes de hígado de ratones muMT infectados se pudo observar una evidente necrosis, vasodilatación y coagulación intravascular. Los hepatocitos de los hígados de los ratones muMT infectados se presentaron redondeados, con mayor tamaño y con citoplasma vacuolizado y núcleos picnóticos. Se observaron estructuras conocidas como cuerpos de Councilman (indicados con flechas), indicativos de que los hepatocitos están sufriendo un proceso de apoptosis. Además se evidenció presencia de infiltrado celular inflamatorio (Fig. 3E - muMT). Los hígados de los ratones controles presentaron un infiltrado multifocal y perivascular leve e hiperplasia de las células de Kupffer (Fig. 3E - WT).

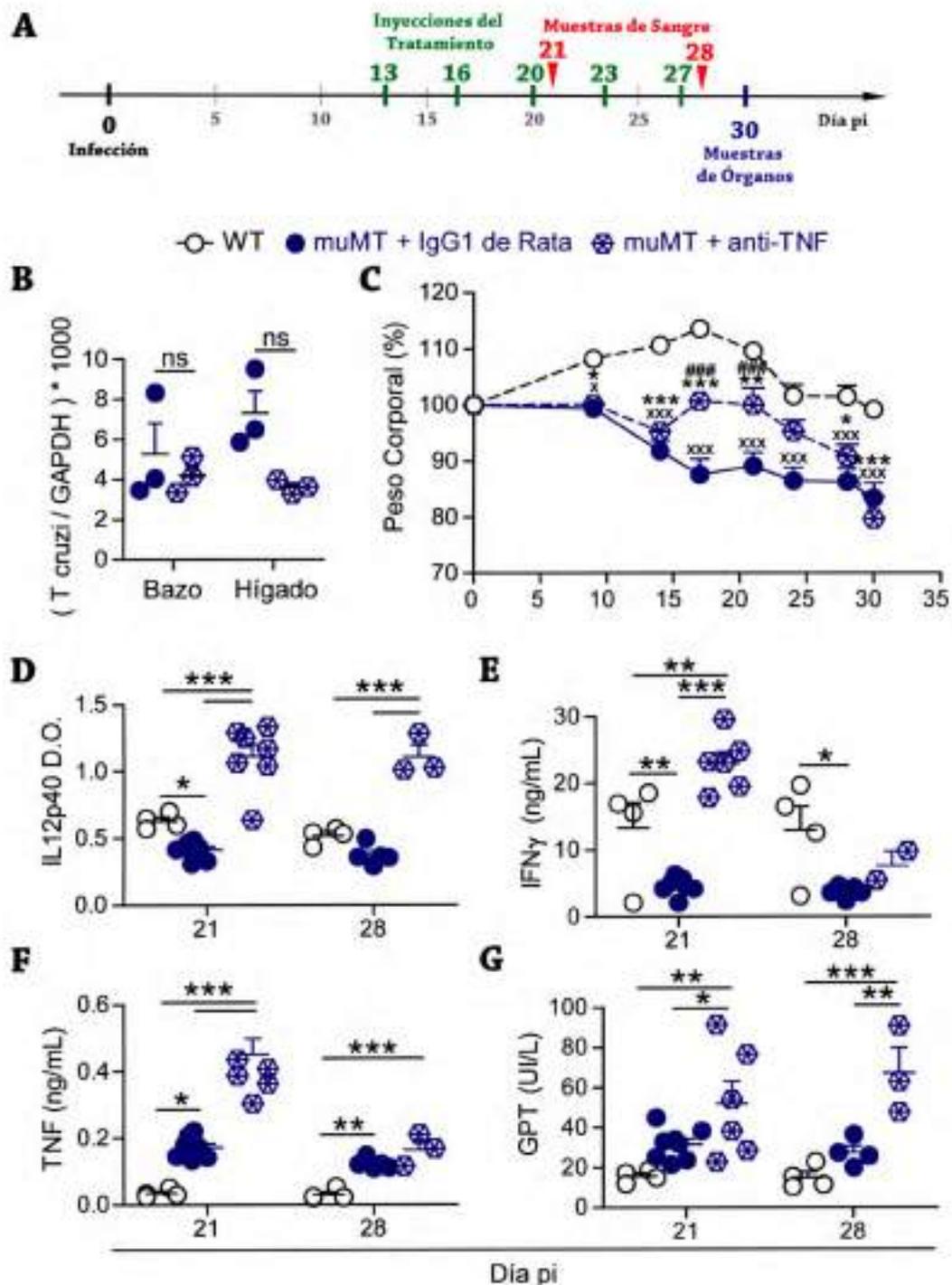
Los resultados analizados en conjunto sugieren que en ausencia de LiB, los ratones infectados con el *T. cruzi* presentan una respuesta inflamatoria desregulada, con un cuadro clínico similar al del shock tóxico, posiblemente mediado por TNF.

Para determinar si el TNF es el mediador de muerte en ratones muMT infectados, decidimos someter a los ratones infectados a un tratamiento con un Ac bloqueante de la actividad del TNF y evaluar las consecuencias del mismo. Este tipo de tratamiento, aunque con diferentes esquemas y dosis, ya ha sido realizado previamente en ratones infectados con *T. cruzi*, [18, 179, 180], con resultados contrapuestos. Por tal motivo, diseñamos un esquema de tratamiento adaptado a nuestro modelo de infección y a los resultados previos obtenidos. Teniendo en cuenta que los ratones WT infectados comienzan a regular esta citoquina pro-inflamatoria a partir del día 13pi, y que el TNF es necesario porque forma parte de la respuesta protectora a tiempos tempranos de la infección, cercanos al día 9pi, decidimos comenzar a inyectar el anti-TNF a partir de los 13 días pi (Fig. 4A) y cada 3 o 4 días, alcanzando 5 inyecciones en total. Además de garantizar la administración semanal

de Ac necesaria, nuestro esquema también fue ideado para manipular los ratones lo menos posible, en vista de no agregar factores potencialmente influyentes de los datos a obtener.

Observamos que el tratamiento con el Ac neutralizante de TNF (clon XT3.11 de BioXcell) demoró la mortalidad de los ratones muMT infectados, pero no fue capaz de evitarla (datos no mostrados). Evidenciamos además que esto no se debería a una reactivación de la replicación del parásito, ya que los ratones muMT tratados con anti-TNF no presentaron diferencias significativas en la carga parasitaria con respecto a la de ratones muMT infectados no tratados a los mismos días pi (Fig. 4B). Observamos una recuperación inicial de los ratones a través de un aumento del peso corporal una vez comenzado el tratamiento (Fig. 4C) y luego una caída abrupta del mismo posterior al día 20pi. Esto se correlacionó, sorprendentemente, con el hecho de que los ratones muMT infectados tratados presentaron una exacerbación de toda la vía pro-inflamatoria tipo 1, evidenciada por el incremento en el plasma de las concentraciones de IL12, IFN $\gamma$ , y TNF (Fig. 4 D, E y F). A pesar de estar bloqueada la actividad biológica de TNF en respuesta al tratamiento, los ratones deficientes en LiB infectados incrementan los niveles de TNF. En concordancia con el efecto dañino de altas concentraciones de TNF sobre hígado [181] observamos que los ratones muMT tratados presentaron un aumento de la actividad de la transaminasa GPT con respecto a ratones muMT no tratados (Fig. 4G). Analizando los resultados obtenidos, es probable que exista un mecanismo de regulación de la vía pro-inflamatoria, en donde el TNF sea capaz de regular la secreción de IL12 y/o IFN $\gamma$ , con lo cual con su neutralización, estas citoquinas se verían desreguladas, induciendo la secreción de mayores cantidades de TNF en ratones muMT tratados.

Podemos concluir que el tratamiento que utilizamos no logró revertir la respuesta inflamatoria y la caquexia de los ratones muMT infectados. Esta respuesta no esperada podría deberse a las características del Ac bloqueante utilizado o a que, bloqueando la actividad del TNF, la ausencia de LiB hace que la respuesta de los animales sea diferente a lo previamente reportado [11, 182].



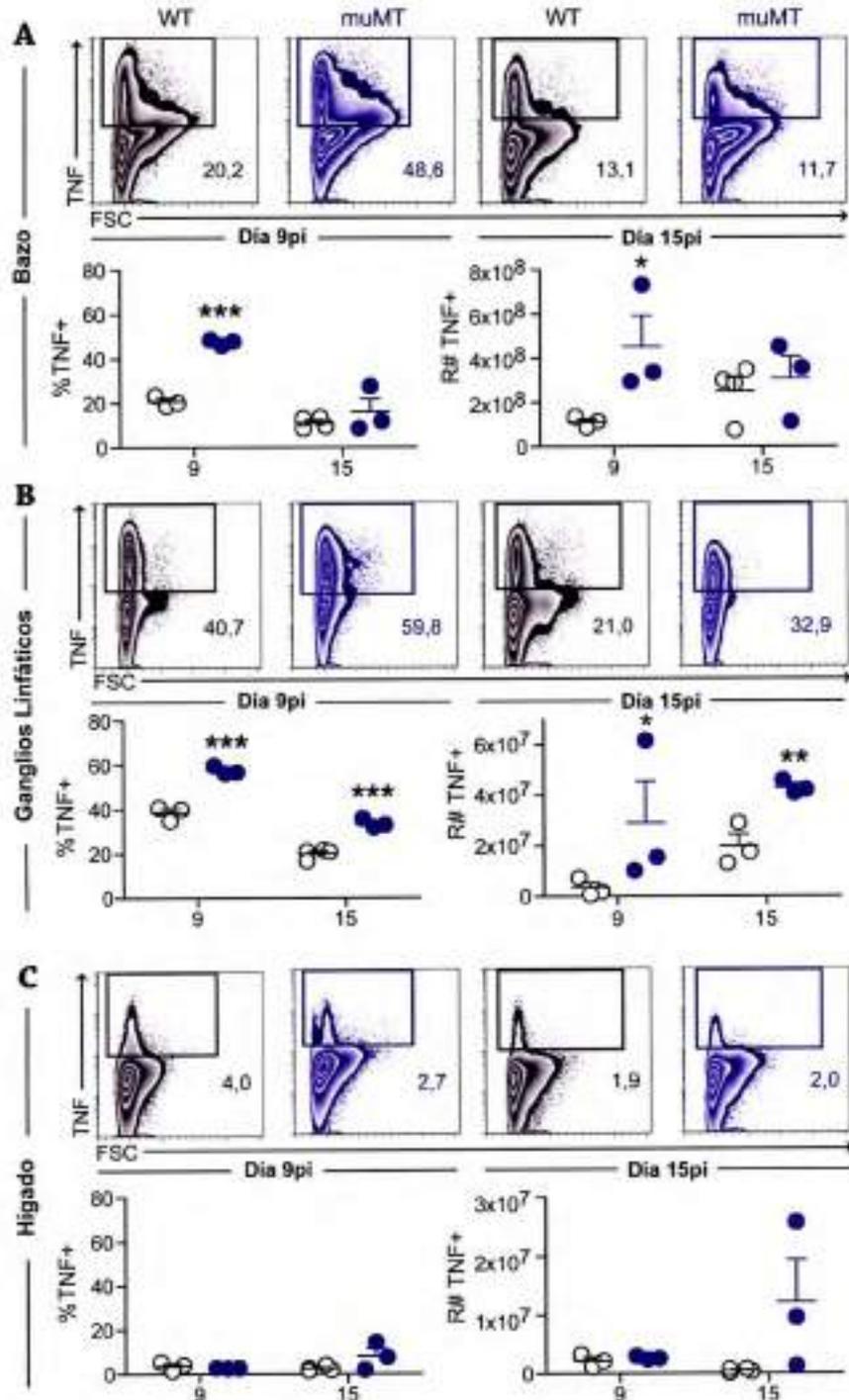
**Figura 4:** El bloqueo de TNF promovió la recuperación del peso corporal en los primeros días *pi* de los ratones muMT infectados con *T. cruzi*, pero a tiempos tardíos los ratones murieron por exacerbación de la respuesta tipo 1. (A) Esquema de inyecciones del Ac anti-TNF (Indicadas en verde) y toma de muestras (Indicadas en rojo). Ratones WT (n=4) y muMT (n=16) fueron infectados con 10000 tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y-br por vía ip. A un grupo de 8 ratones muMT se les inyectó un Ac anti-TNF de rata, y a otro grupo de 8 ratones un Ac control (IgG1 de rata) de especificidad no relacionada, de acuerdo al esquema mostrado en A) por vía ip. B) ADN satelital de *T. cruzi* determinado por PCR en tiempo real relativo a GAPDH. C) cinética de peso corporal considerando 100% el peso inicial de los ratones (día Dpi). D) Niveles plasmáticos de IL12p40, E) IFN $\gamma$  y F) TNF evaluados por ELISA y G) de la actividad de GPT analizados a los 21 y 28 días *pi*. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  Anova de una vía con post-Test de Bonferroni. x: WT vs muMT, \* muMT tratado con anti-TNF vs WT; # muMT tratado vs muMT. Experimento representativo de 2.

### **3.2] Los LiTCD4<sup>+</sup> de ratones muMT infectados presentan un perfil pro-inflamatorio**

Debido a que los altos niveles de TNF están asociados a la caquexia y sobrevida de los ratones muMT infectados y que el mismo no pudo ser regulado en ausencia de LiB, continuamos nuestro estudio analizando las poblaciones celulares productoras de esta citoquina y su distribución en órganos linfáticos secundarios e hígado.

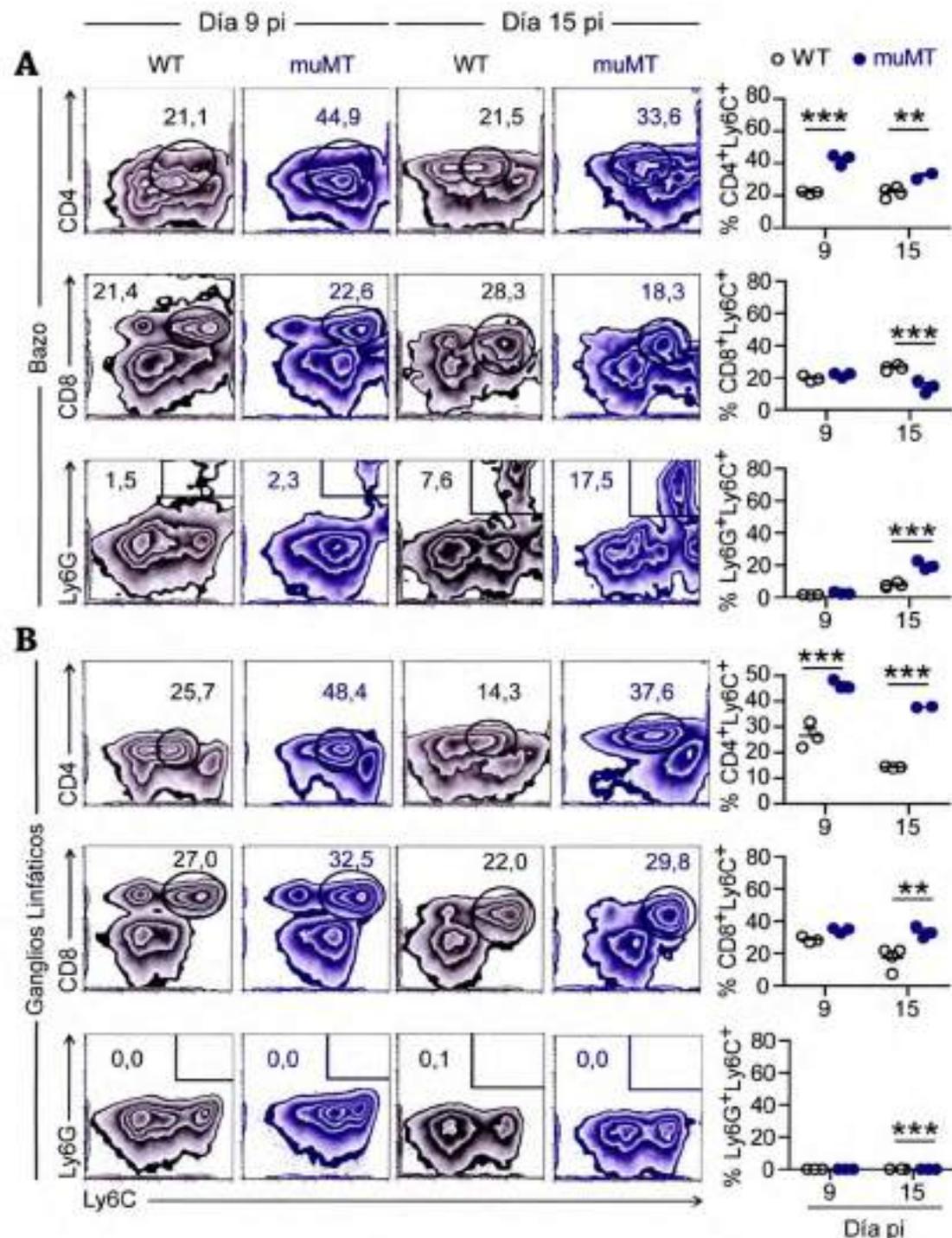
Evaluamos la frecuencia de células productoras de TNF por citometría de flujo intracelular, y para expresar estos datos porcentuales en número de células tuvimos en cuenta que la cantidad de células de los órganos linfáticos de los ratones muMT difiere considerablemente de los valores de ratones WT, siendo diez veces menor. Si bien en ambos grupos experimentales la celularidad incrementa como consecuencia de la infección, el número absoluto de células de los ratones muMT infectados puede ser menor o igual al del WT. Es por ello que una comparación del número de células TNF<sup>+</sup> no reflejaría cuánto incrementa la población de células TNF<sup>+</sup> en ausencia de LiB. Para poder mostrar los cambios que ocurren en el número de células productoras de TNF, como consecuencia de la infección, decidimos graficar el número de células TNF<sup>+</sup> teniendo en cuenta el incremento en celularidad en cada grupo experimental en particular. El número relativo graficado se obtuvo del cociente entre el número de células totales del ratón infectados/células promedio del órgano de un ratón no infectado. De esta forma pudimos hacer una comparación del crecimiento o involución de la población TNF<sup>+</sup> en ambas cepas de ratones infectados.

Con respecto a la frecuencia de células productoras de TNF, observamos que los ratones muMT, al día 9pi, presentaron un mayor porcentaje de células TNF<sup>+</sup> en bazo y en ganglios linfáticos inguinales (Fig. 5A y B) y no encontramos diferencias significativas en los porcentajes de la población TNF<sup>+</sup> en hígado (Fig.5C). Al día 15pi observamos un aumento significativo en el porcentaje y número de células productoras de TNF solamente en ganglios linfáticos inguinales, y no hubo diferencias significativas en bazo e hígado (Fig. 5A, B y C).



**Figura 5: Ratones muMT infectados con *T. cruzi* presentaron un mayor porcentaje y número relativo de células productoras de TNF en bazo y ganglios linfáticos inguinales.** Ratones WT (n=10) y muMT (n=8) fueron infectados por vía ip con 10000 tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y-br. A los días 9 y 15pi, grupos de 4-5 ratones fueron sacrificados. Los esplenocitos totales (A), leucocitos de ganglios linfáticos inguinales (B) y leucocitos infiltrantes de hígado (C) fueron obtenidos e incubados durante 5h con PMA, ionomicina y Brefeldina A. Luego de realizar la tinción intracelular con anti-TNF marcado con fluorocromo, las muestras fueron procesadas por citometría de flujo y analizadas en Flow Jo. Se muestran dot-plots de TNF vs FSC representativos de cada grupo de ratones a los días 9 y 15pi. El "gate" indica el porcentaje de células TNF<sup>+</sup>. Para cada órgano se muestran experimentos representativos comparando los porcentajes de células productoras de TNF en cada órgano y el número relativo [R#] de células TNF<sup>+</sup> en cada órgano (células totales/células promedio del órgano de un ratón no infectado). \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 test t de Student. Experimento representativo de 4.

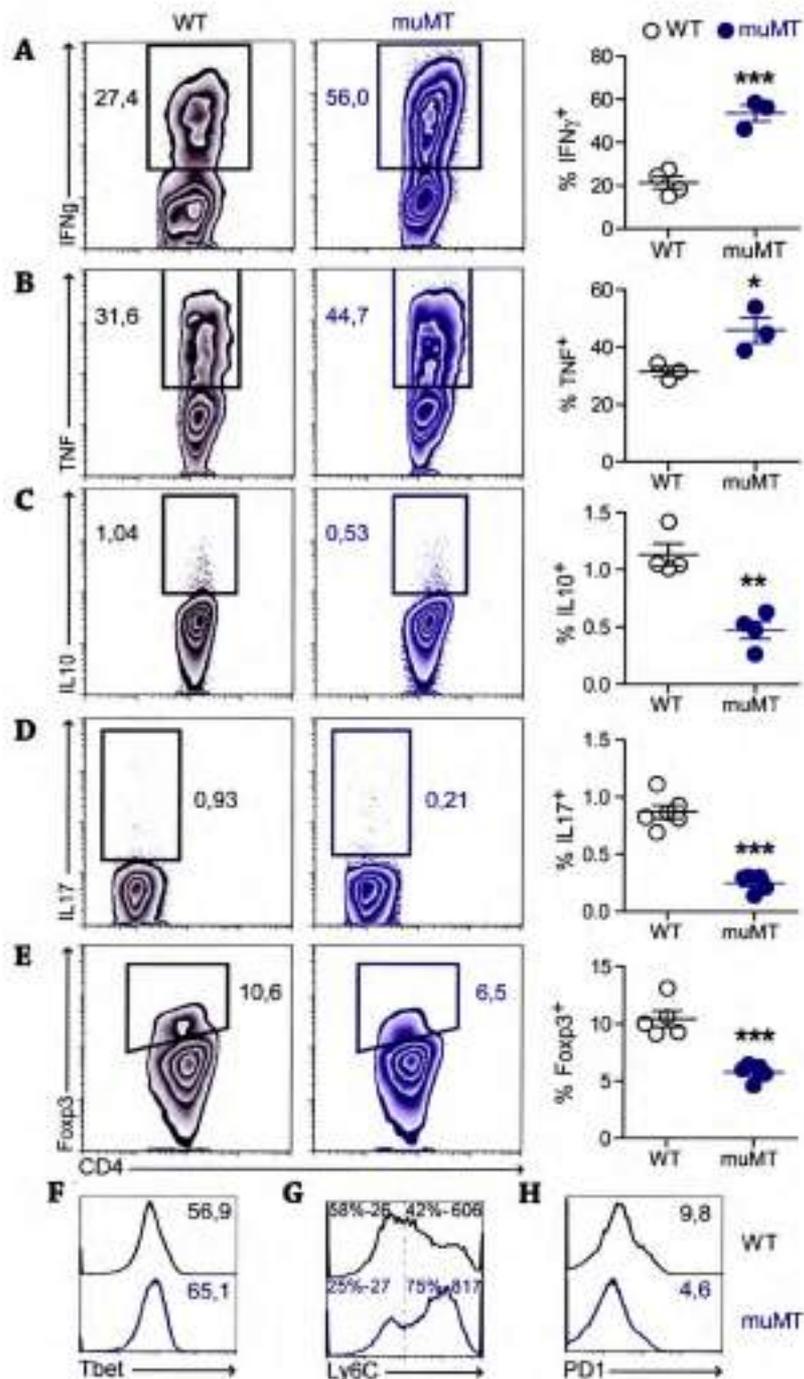
Diversas poblaciones leucocitarias tales como monocitos, macrófagos, neutrófilos, CD4, LiT, y LiB, entre otras, son capaces de secretar TNF [78, 183, 184]. Con el objeto de identificar las poblaciones celulares secretoras de TNF en ambos grupos de ratones infectados con *T. cruzi*, realizamos un ensayo de inmunofluorescencia en donde las células fueron incubadas con Acs reactivos para moléculas específicas de linaje celular marcados con fluorocromos. Las células marcadas fueron evaluadas por citometría de flujo. Dentro de la población TNF<sup>+</sup>, evaluamos la expresión de moléculas de superficie tales como CD3, CD4, CD8 (para identificar LiT) y Ly6C, Ly6G, CD11c, CD11b (para identificar monocitos, neutrófilos y CDs). Observamos que la principal población TNF<sup>+</sup>, en bazo y en ganglios linfáticos inguinales obtenidos a los días 9 y 15pi, estaba compuesta por LiT CD4<sup>+</sup> tanto en los ratones WT como en los muMT infectados (Fig.6). En los ratones muMT, la población CD4<sup>+</sup> productora de TNF expresó mayoritariamente el marcador Ly6C, el cual ha sido descrito como un receptor indicativo de un fenotipo Th1 [185, 186]. En los ratones WT infectados, dentro de la población de LiT CD4<sup>+</sup> productora de TNF, se observó una población negativa para Ly6C y otra positiva (Fig. 6 A y B). Además de los LiT CD4<sup>+</sup>, la población productora de TNF también estuvo compuesta, aunque en menor medida, por LiT CD8<sup>+</sup> (en bazo y ganglios linfáticos inguinales) y neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>) (solo en bazo) (Fig. 6 A y B). Los datos indican que los ratones muMT infectados no sólo presentaron una mayor proporción de células secretoras de TNF que sus contrapartes WT, sino que a su vez éstas células expresaron un perfil pro-inflamatorio más acentuado.



**Figura 6:** Ratones *muMT* infectados presentaron diferencias en la composición de la población secretora de TNF con respecto a ratones WT infectados. Ratones WT y *muMT* fueron infectados, por vía *ip*, con 10000 tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y-br y grupos de 3-6 ratones fueron sacrificados al día 9 y 15pi. Las células de bazo (A) y de ganglios linfáticos inguinales (B) fueron obtenidas y cultivadas con PMA-Ionomomicina y Golgi Stop durante 5h. Luego fueron fijadas, permeabilizadas y tñidas con anti- TNF, CD3, CD4, CD8, Ly6C, Ly6G de ratón y adquiridos en un citómetro de flujo. Se muestran dot-plots representativos de cada órgano, de cada grupo de ratones, a cada día pi. Gate realizado en la población TNF<sup>+</sup>. Los gráficos a la derecha muestran el compilado de los porcentajes celulares en todos los ratones de cada grupo [círculo vacío: ratones WT, círculo lleno: ratones *muMT*]. \*\**p*<0,01 \*\*\**p*<0,001 Test t de Student. Experimento representativo de 3.

Debido a esto, decidimos evaluar diferentes citoquinas y factores de transcripción que definan con mayor certeza si efectivamente los LiT CD4<sup>+</sup> poseen un perfil pro-inflamatorio de tipo 1. Por citometría de flujo, determinamos el porcentaje de la población de LiT CD4<sup>+</sup> que producía citoquinas asociadas a un perfil pro-inflamatorio de tipo 1, tales como IFN $\gamma$  y TNF (Fig. 7A, B). Observamos que, en comparación con ratones WT infectados, los ratones muMT con 9 días de infección presentaron un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje tanto de LiT CD4<sup>+</sup> productores de IFN $\gamma$  (Fig. 7A) como de productores de TNF (Fig. 7B). Por el contrario y en concordancia con un perfil pro-inflamatorio, los ratones deficientes en LiB maduros infectados presentaron una disminución significativa en los porcentajes de LiT CD4<sup>+</sup> productores de IL10 (Fig. 7C), citoquina asociada a un perfil regulatorio. También observamos que los ratones muMT infectados presentaron una disminución en el porcentaje de LiT CD4<sup>+</sup> IL17<sup>+</sup> (Fig. 7D), citoquina con potencial anti-inflamatorio en la enfermedad de Chagas [19, 31]. Asimismo, los ratones muMT infectados presentaron un porcentaje significativamente menor de LiT CD4<sup>+</sup> que expresaban el factor de transcripción Foxp3 (Fig. 7E), característico de la población Treg [110], y un aumento en el factor de transcripción Tbet (Fig. 7F) asociado a un perfil pro-inflamatorio de tipo 1 [187]. A su vez, tal como mostramos en la Fig. 6, los LiT CD4<sup>+</sup> de ratones muMT infectados, presentaron un mayor porcentaje de células Ly6C<sup>+</sup> y un menor porcentaje de Ly6C<sup>-</sup>, y a su vez, la población Ly6C<sup>+</sup> presenta mayor intensidad de fluorescencia media (IFM) de esta molécula (Fig. 7G). En conjunto, estos datos sugieren que la población de LiT CD4<sup>+</sup> en ratones muMT infectados presentó predominantemente un perfil de tipo pro-inflamatorio de tipo 1.

Determinamos además, en la población de LiT CD4<sup>+</sup>, la expresión de receptores de superficie asociados a funciones inhibitorias de la respuesta celular, tales como CTLA4 y PD1 [134, 135, 188]. No encontramos diferencias en la expresión de CTLA4 entre las poblaciones de ambas cepas de ratones infectados (datos no mostrados), pero la expresión de PD1 fue menor en ratones muMT infectados (Fig. 7H), sugiriendo que esta población sería menos susceptible a la regulación mediada por PDL1 [189-191].



**Figura 7:** *LIT CD4<sup>+</sup> de ratones muMT infectados presentaron un perfil pro-inflamatorio más exacerbado que los LIT CD4<sup>+</sup> de ratones WT infectados.* Ratones WT y muMT fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y-br y grupos de 3-6 ratones fueron sacrificados al día 9pi. Los esplenocitos fueron obtenidos y cultivados con PMA-Ionomicina y Golgi Stop durante 5h. Luego fueron fijados, permeabilizados y teñidos con anti- CD3, CD4, IFN $\gamma$ , TNF, IL10, IL17, FoxP3, Tbet, Ly6C y PD1 de ratón, y adquiridos en un Citómetro de flujo. Se muestran dot-plots representativos de cada grupo de ratones en cuanto a la expresión de (A) IFN $\gamma$ , (B) TNF, (C) IL10, (D) IL17, (E) Foxp3 en la población de LIT CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. A la derecha de la figura se presentan gráficos mostrando los porcentajes de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> productoras de cada citoquina en la totalidad de ratones analizados. Al final de la figura se presentan histogramas mostrando la expresión de Tbet (F), Ly6C (G) y PD1 (H) en la población de LIT CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> indicando la IFM (F) (H), o el porcentaje de células Ly6C<sup>+</sup> y Ly6C<sup>-</sup> junto con la intensidad de fluorescencia media para cada población (G). \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 Test t de Student. Experimento representativo de 4.

### 3.3] Los LiT CD4<sup>+</sup> de ratones muMT infectados modifican el fenotipo de los LiT CD4<sup>+</sup> de ratones WT infectados

En los ratones infectados con *T. cruzi* observamos que la inhibición de la respuesta pro-inflamatoria tipo 1 ocurre alrededor del día 13pi. Los LiT pro-inflamatorios presentes al día 9pi en los ratones WT infectados aparentemente son regulados negativamente, pero no ocurre lo mismo en los LiT de los ratones deficientes en LiB. Para evaluar si LiT CD4<sup>+</sup> inflamatorios presentes en los ratones muMT pueden ser regulados de la misma forma que los LiT de ratones WT, realizamos un experimento de transferencia, en donde LiT CD4<sup>+</sup> purificados de ratones muMT (CD45.2) a los 9 días pi fueron transferidos a ratones WT (CD45.1) con los mismos días pi. En paralelo, un grupo de ratones WT y otro de muMT infectados fueron estudiados como controles (Ver esquema en Fig. 8A). Al día 15pi se obtuvieron los bazo y ganglios linfáticos inguinales de todos los ratones en cada grupo, y por citometría de flujo se evaluó la población de LiT CD4<sup>+</sup>, y los porcentajes de LiT CD4<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> y Ly6C<sup>+</sup>. Se puede observar que, al día 15pi, los LiT CD4<sup>+</sup> CD45.1, de los ratones WT receptores, sufrieron una modificación en el perfil de expresión de TNF y Ly6C, asemejando su perfil al de los ratones muMT infectados al día 15pi (Fig. 8B y 8C). Los ratones WT infectados transferidos con LiT provenientes de muMT presentaron en bazo, al igual que los ratones muMT, un aumento significativo en el porcentaje de la población Ly6C<sup>+</sup>TNF<sup>-</sup> dentro de la población de LiT CD4<sup>+</sup>, con respecto a ratones WT no transferidos (Fig. 8B y C). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de la población Ly6C<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> dentro de la población de LiT CD4<sup>+</sup> entre los grupos. En ganglios linfáticos inguinales, los ratones muMT presentaron un aumento significativo en el porcentaje de LiT CD4<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> con respecto a ratones WT infectados, y de manera similar, ratones WT transferidos con LiT CD4<sup>+</sup> de ratones muMT también presentaron un aumento significativo en la población Ly6C<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> (Fig. 8C). Ratones WT transferidos con células de muMT también presentaron, en los ganglios linfáticos inguinales, un aumento significativo en el porcentaje de la población Ly6C<sup>+</sup>TNF<sup>-</sup> mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes presentes en ratones WT o muMT infectados de dicha población (Fig. 8C). En base a los resultados obtenidos, analizados en conjunto, podemos concluir que los LiT CD4<sup>+</sup> que se generan durante la infección con *T. cruzi* en ausencia de LiB, los cuales tienen un marcado perfil pro-inflamatorio tipo 1, no pueden ser regulados y son capaces de alterar el perfil de otros LiT CD4<sup>+</sup> independientemente de la presencia de LiB.

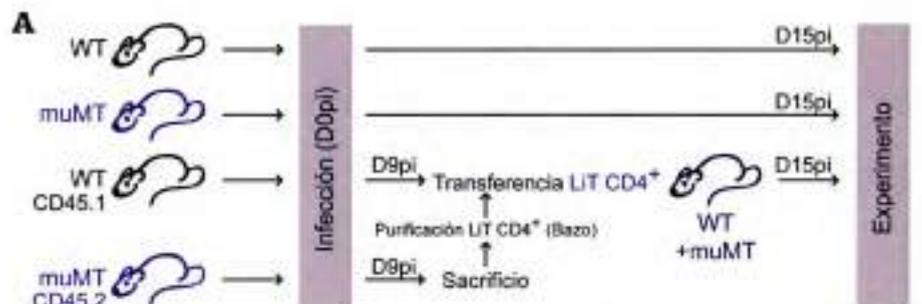
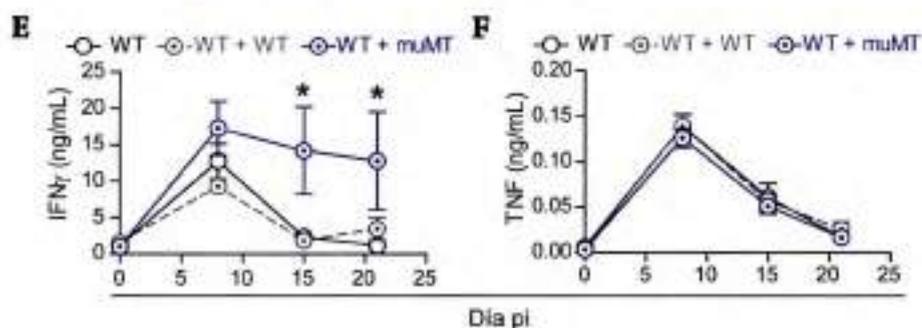
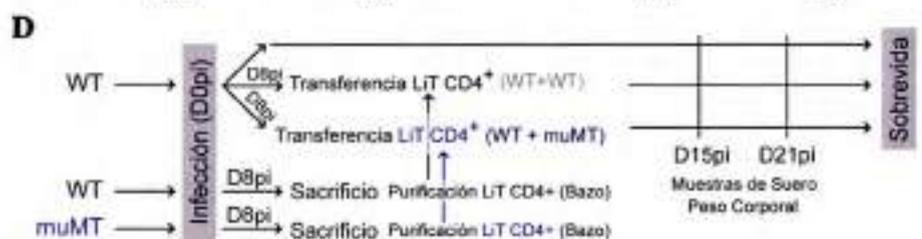
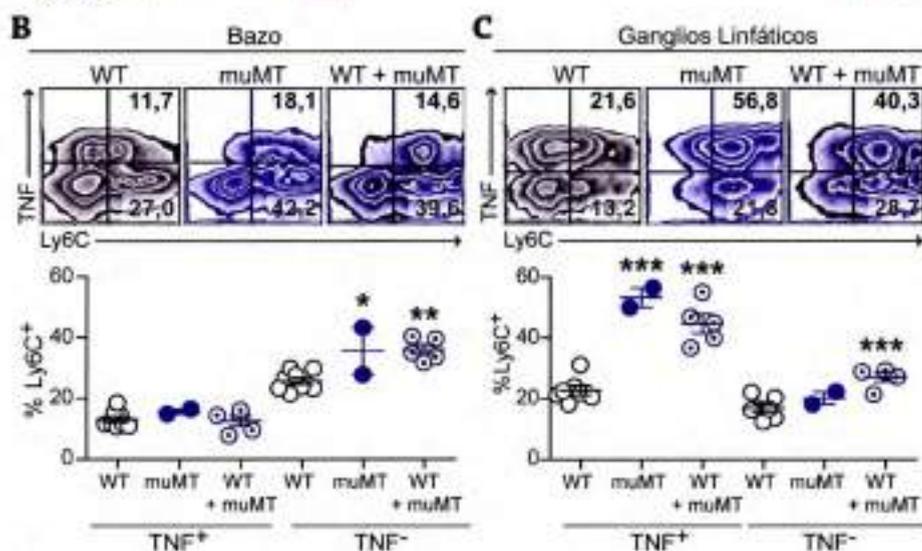


Figura 8: La transferencia de LIT CD4<sup>+</sup> de ratones muMT infectados a ratones WT infectados alteró el perfil de los LIT CD4<sup>+</sup> en los ratones receptores y aumentó la secreción de IFN $\gamma$  sistémico.

(A) Esquema experimental de transferencia celular: ratones WT (n=12) y muMT (n=4) fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y-br por vía ip. Ratones muMT infectados (n=2) fueron sacrificados al día 9pi y se purificaron los LIT CD4<sup>+</sup> de sus esplenocitos. Estos LIT fueron transferidos por vía endovenosa a ratones WT infectados (n=4), con día 9pi (WT+muMT). En el día 15pi se sacrificaron todos los ratones obteniéndose los esplenocitos



y células de ganglios linfáticos inguinales. Las células se estimularon durante 5h con PMA-Ionomicina en presencia de Brefeldina A, y luego se procedió a su fijado y tinción intracelular con Abs anti-CD3, CD4, Ly6C y TNF. Se muestra un dot-plot representativo de cada grupo de animales en la población CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (CD45.1<sup>+</sup> en ratones WT). Los "gates" indican los porcentajes de células Ly6C<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> y Ly6C<sup>+</sup>TNF<sup>-</sup>, y se muestra un gráfico con los porcentajes de estas poblaciones para todos los animales estudiados para bazo (B) y ganglios linfáticos inguinales (C). D) Esquema experimental: ratones WT (n=15) y ratones muMT (n=2) infectados con *T. cruzi* por vía ip. Los ratones muMT infectados y 3 ratones WT infectados fueron sacrificados al día 8pi y a partir de sus esplenocitos se purificaron los LIT CD4<sup>+</sup>. Estos LIT fueron transferidos por vía endovenosa a dos grupo de ratones WT infectados (n=4 en cada grupo) el mismo día; "WT+WT" Ratones WT que recibieron LIT CD4<sup>+</sup> WT y "WT+muMT" ratones que recibieron LIT CD4<sup>+</sup> muMT. "WT": ratones WT infectados sin transferencia. Se obtuvieron muestras de plasma a los días 0, 8, 15 y 21pi y los niveles séricos de IFN $\gamma$  (E) y de TNF (F) se determinaron por ELISA. \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 Anova de una vía con post-Test de Bonferroni.

Diversos reportes han correlacionado los niveles de citoquinas pro-inflamatorias con el desarrollo de la patología chagásica [15, 16, 73], y a su vez, se ha asociado la producción de estas citoquinas con el infiltrado de LiT CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en corazón [15, 74, 75]. Con el objeto de evaluar si los LiT de ratones muMT, también son capaces de alterar el perfil de producción de citoquinas y la evolución de la enfermedad medida en términos de caquexia, realizamos otros experimentos de transferencia celular (Fig. 8 D). Ratones WT (n=12) fueron identificados y pesados para determinar su peso corporal inicial. Luego se tomó una muestra de plasma a cada uno de ellos. Estos ratones WT, en conjunto con otros 3 ratones WT (como fuente de LiT CD4<sup>+</sup>) y con 2 ratones muMT (como fuente de LiT CD4<sup>+</sup> pro-inflamatorios desregulados) fueron infectados con 10000 tripomastigotes de *T. cruzi* (ver esquema en Fig. 8D). Al día 8pi, los ratones individualmente identificados fueron sangrados para obtener una muestra de plasma y fueron pesados nuevamente. Posteriormente, un grupo de 4 de estos ratones WT fueron transferidos con LiT CD4<sup>+</sup> provenientes de los ratones WT y un segundo grupo de 4 ratones recibieron LiT CD4<sup>+</sup> provenientes de ratones muMT (WT + muMT). Un tercer grupo de ratones WT, sin transferir, fue mantenido como control (Fig. 8D). A los días 15 y 21pi, se obtuvieron muestras de sangre de los tres grupos de ratones, y se determinó su peso corporal. Cabe señalar que todos los ratones sobrevivieron hasta el día 30pi, y no se encontró ninguna disminución en los pesos corporales en ningún grupo (datos no mostrados). En muestras de plasma se determinó la concentración de IFN $\gamma$  y de TNF, y se graficó la cinética de estas citoquinas. Con respecto al IFN $\gamma$ , los tres grupos de ratones se comportaron de manera homogénea hasta la transferencia, mostrando un pico en la concentración de IFN $\gamma$  al día 8pi, correspondiente al pico de parasitemia como se describió previamente. El grupo de ratones WT que recibió LiT CD4<sup>+</sup> de sus análogos WT, no mostró ninguna alteración en su cinética de IFN $\gamma$ , mientras que el grupo receptor de LiT CD4<sup>+</sup> de ratones muMT mantuvo significativamente elevadas las concentraciones de IFN $\gamma$  en plasma al día 15 y 21pi (Fig. 8E). Al contrario de lo esperado no observamos diferencias en las concentraciones plasmáticas de TNF entre los grupos analizados (Fig. 8F).

### **3.4] Durante la infección con *T. cruzi*, se inducen poblaciones de LiB que podrían tener funciones regulatorias**

Dado que ratones muMT carecen de LiB maduros, y esta deficiencia podría ser la responsable de las alteraciones observadas en estos ratones durante la infección con *T. cruzi*, decidimos profundizar el estudio de las poblaciones de LiB analizando los cambios fenotípicos que sufren durante la infección y su capacidad de producción de citoquinas.

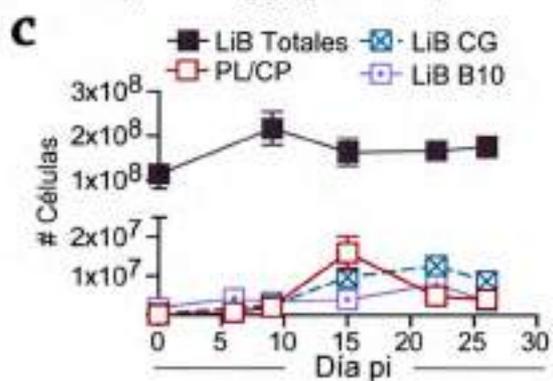
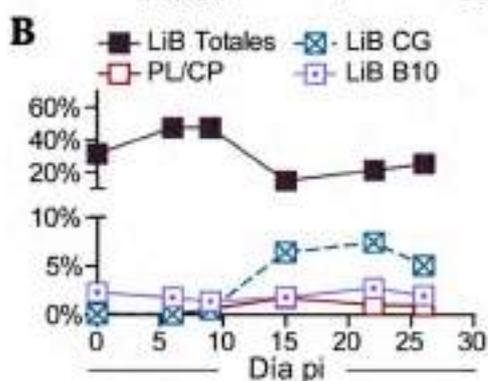
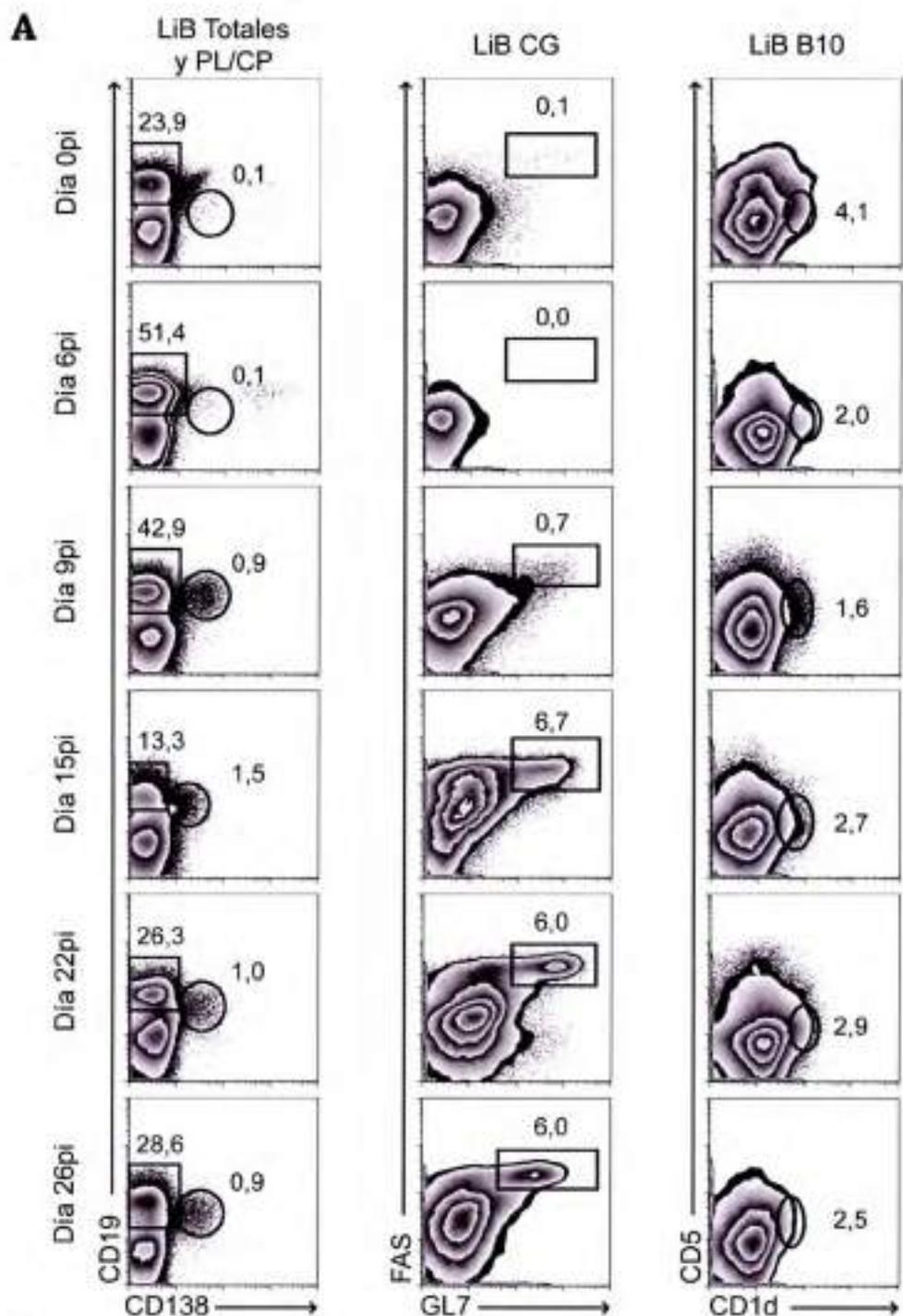
Como primera instancia realizamos un estudio cinético en el que evaluamos las poblaciones de LiB, en diferentes órganos de los ratones WT infectados, en función de los días pi. Elegimos bazo, ganglios linfáticos inguinales e hígado, como órganos de estudio. Para ello, un grupo numeroso de ratones fue infectado con 10000 tripomastigotes de *T. cruzi*, tal como lo hicimos a lo largo de la tesis, y diferentes grupos de ellos fueron sacrificado a diferentes días pi. En las células de los órganos obtenidos se evaluaron las diferentes poblaciones de LiB por citometría de flujo.

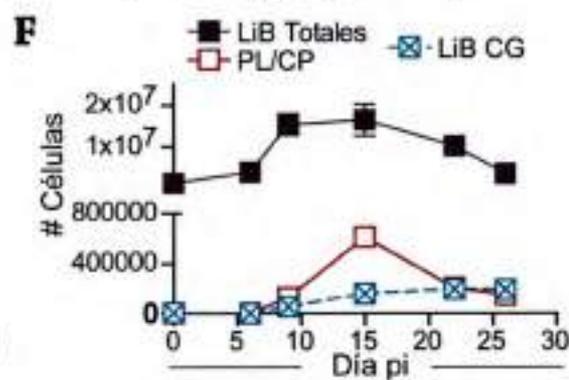
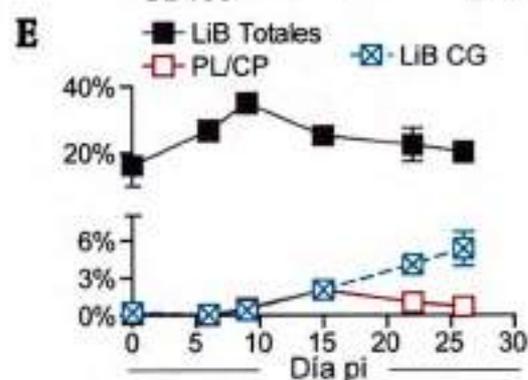
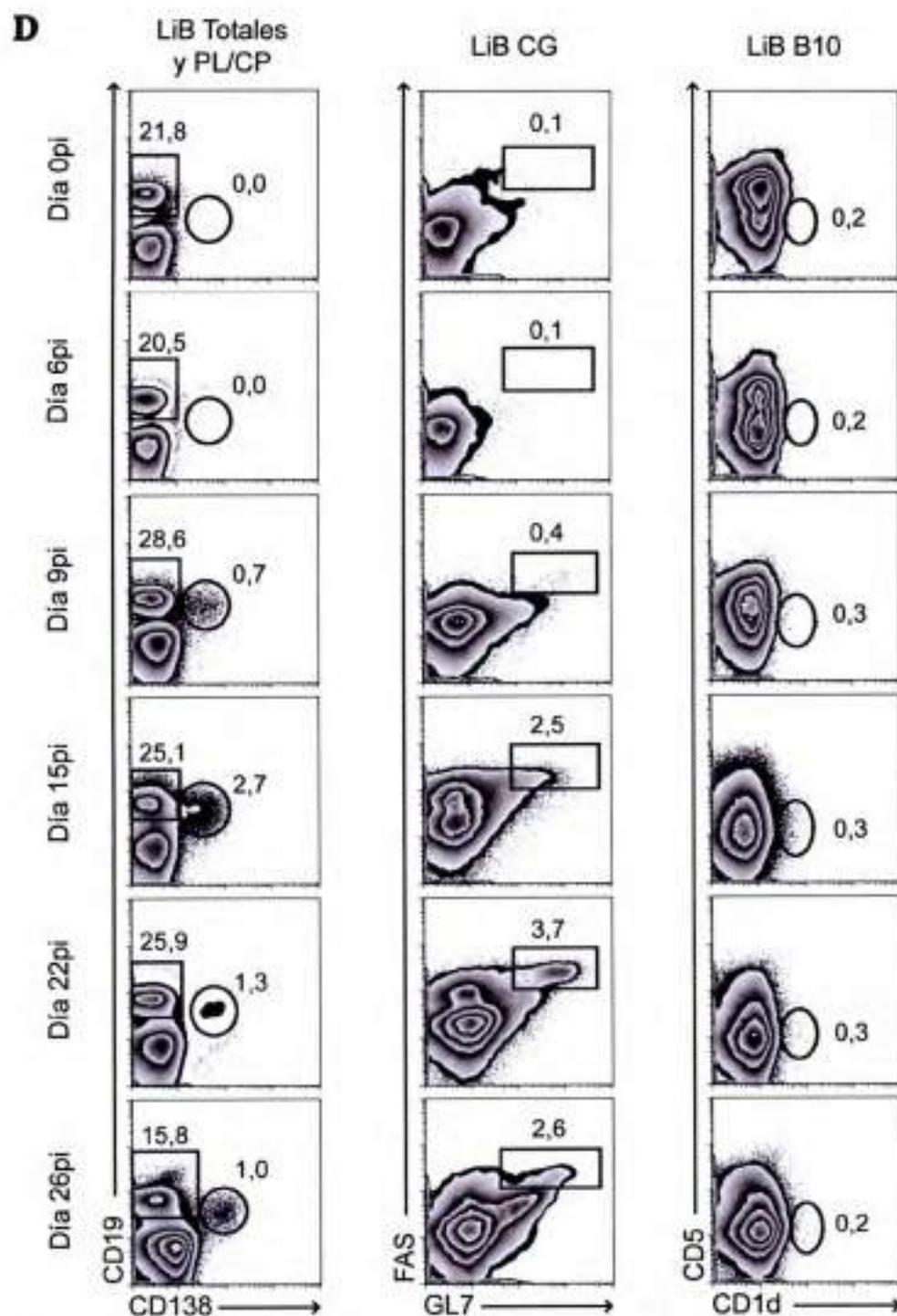
En bazo encontramos un aumento inicial del porcentaje de LiB (CD19<sup>+</sup>) con respecto a la totalidad de esplenocitos (Fig. 9A, B) y luego, desde el día 15pi, una disminución hacia los porcentajes iniciales (correspondientes al día 0pi). En cuanto al número de células de la población, la misma presentó un pico en el día 9pi, y luego se redujo hacia el día 15pi, pero manteniéndose elevada con respecto a la de los animales no infectados (día 0pi) (Fig. 9C). Estos valores fueron sostenidos hasta el último día evaluado en la cinética (día 26pi) (Fig. 8C). Además, evaluamos la población de CP, las cuales corresponden al estadio de diferenciación terminal de los LiB y son las células secretantes de Acs identificadas con la expresión de CD138. Evidenciamos en bazo un aumento porcentual de la población CD19<sup>int</sup>CD138<sup>+</sup> a partir del día 9pi (Fig. 8A, B) presentando el mayor incremento a los 15 días pi, el cual disminuye levemente días más tarde (Fig. 8A, B). La cantidad de células correspondiente a la población de CP presentó un comportamiento similar a la de los LiB; determinamos que en bazo la cantidad de CP incrementó sobre todo en el día 15pi y luego este número disminuyó hacia el día 22 y 26pi (Fig. 8C).

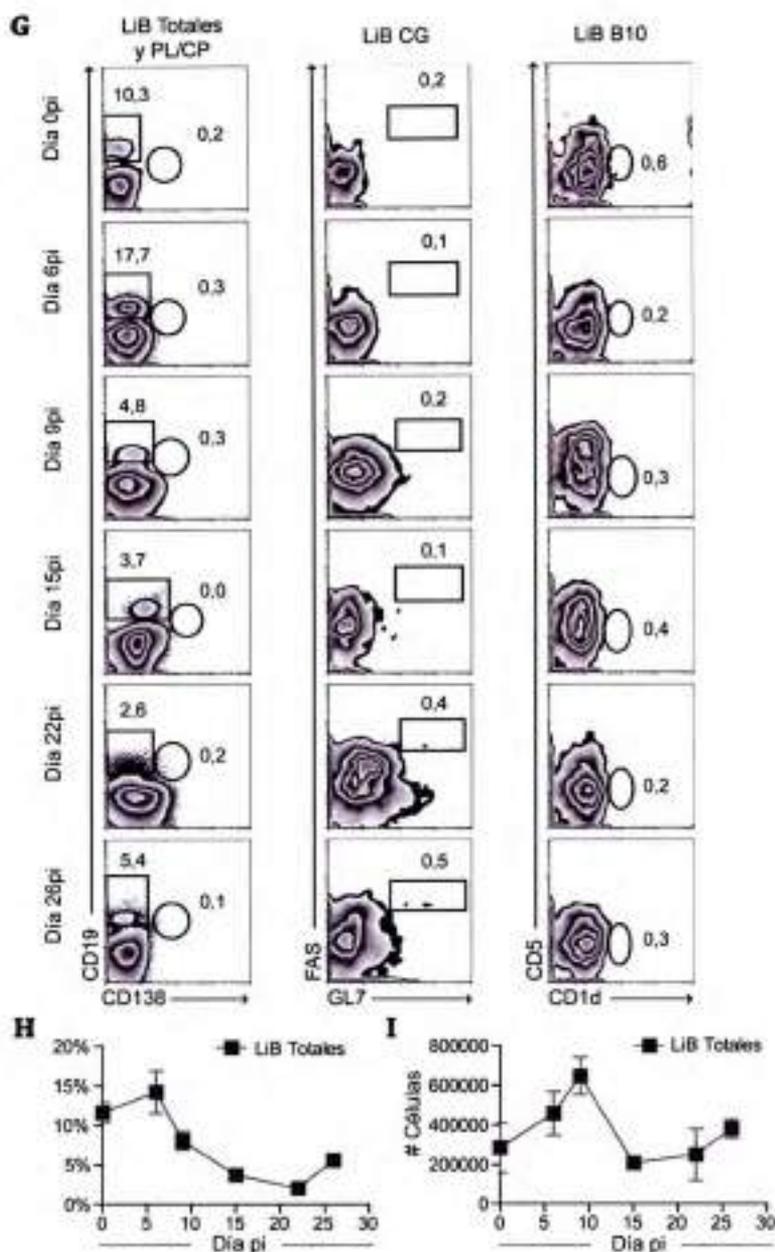
Además, dentro de la población general de células de linaje B, evaluamos dos subpoblaciones: la población de CG, caracterizada por la co-expresión de FAS y GL7, y la población "B10" previamente reportada con funciones regulatorias [149] e identificada por la expresión intermedia de CD5 y expresión de CD1d. Hallamos que la población de LiB de CG (FAS<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>) comenzó a aparecer en el día 9pi, pero tuvo un marcado aumento porcentual y de valor absoluto en el día 15pi (Fig. 8A, B, C). Este porcentaje y número de células fue sostenido hacia días más tardíos pi. Con respecto a la población B10 durante la infección con *T. cruzi*, encontramos que la misma sufrió una leve disminución porcentual con respecto a su porcentaje inicial en bazo (animal no infectado), presentando un pico de disminución hacia el día 9pi (Fig. 8A, B). Luego incrementó desde el día 15pi, alcanzando las proporciones del animal no infectado en el día 22pi (Fig. 8A, B). Los valores absolutos de esta población se comportaron de manera diferente; inicialmente presentaron un leve aumento, desde el día 6 hasta el 15pi, y luego mostraron un aumento marcado hacia el día 22pi, disminuyendo nuevamente hacia el día 26pi (Fig. 8C). Notablemente, esta población sólo fue detectada en bazo.

Con respecto a ganglios linfáticos inguinales, en términos generales, la población de LiB totales se comportó de una manera similar a como lo hace en bazo. Porcentualmente, esta población presentó un aumento desde el día 6pi, alcanzando un pico máximo porcentual en el día 9pi (Fig. 9D, E). Luego este porcentaje disminuyó paulatinamente, alcanzando valores similares a los del animal no infectado (Fi. 9D, E). El número total de LiB mostró un leve aumento hacia el día 6pi, y luego un marcado incremento en el día 9pi, el cual fue sostenido hasta el día 15pi, para luego disminuir levemente hacia días posteriores pi (Fig. 9F). La población de CP se hizo evidente en el día 9pi (Fig. 9D) y tuvo un pico de aumento porcentual dentro de las células totales de bazo en el día 15pi (Fig. 9D, E). En días posteriores pi el porcentaje de esta población disminuyó, pero fue mayor al que presenta el animal no infectado, en el cual esta población, como es de esperar, fue prácticamente indetectable (Fig. 9D, E). Los valores absolutos de la población de CP tuvieron el mismo comportamiento que a nivel porcentual; presentaron un pico de expansión en el día 15pi, y luego esta expansión se retrajo, disminuyendo la cantidad de células en los días 22 y 26pi (Fig. 9F). En el caso de la población de CG aumentó levemente en el día 9pi, y presentó un marcado aumento porcentual en el día 15pi, manteniéndose su expansión en los días 22 y 26pi (Fig. 9D, E). En cuanto a su número, la población de CG presentó un leve aumento en el día 9pi, y uno marcado en el día 15pi, alcanzando su máximo en el día 22pi (Fig. 9F). La cantidad de LiB de CG se mantuvo hasta el día 26pi (Fig. 9F). Por otra parte, la población previamente descripta como B10 no fue detectada en ganglios linfáticos inguinales.

Para finalizar, en hígado sólo fue posible observar una población con marcador de linaje B pero no se evidenciaron CP, ni de LiB de CG, ni B10 (Fig. 9G). La población de LiB sufrió una disminución progresiva porcentual desde el día 9pi, aumentando levemente en el día 26pi (Fig. 9G, H). En contraposición a esto, los valores absolutos mostraron que el infiltrado de LiB en hígado aumentó desde el día 6pi, alcanzando un pico en el día 9pi (Fig. 9I) Hacia el día 15pi, el infiltrado disminuyó, manteniéndose constante, o con un leve aumento, hacia el día 26pi, alcanzando valores similares al del animal no infectado (Fig. 9I).

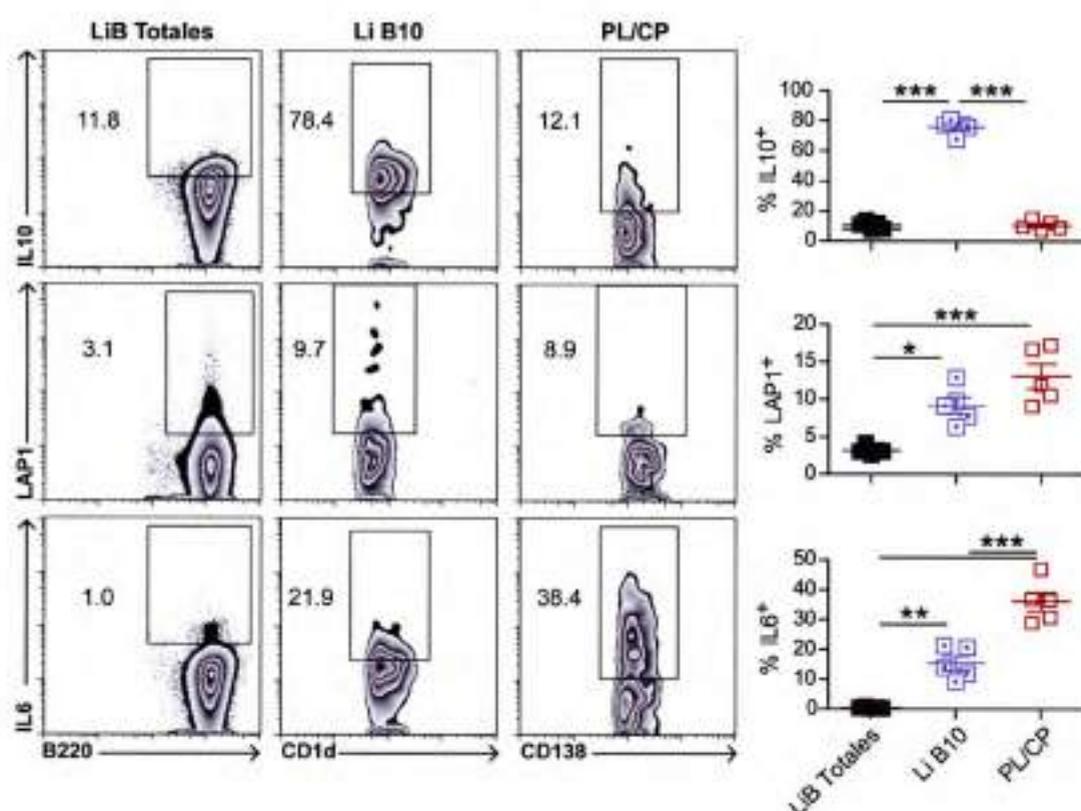






**Figura 9:** En la infección con *T. cruzi* se produjo un aumento en el número de LiB de CG y PL/CP en bazo y ganglios linfáticos inguinales pero no en hígado. R ratones WT (n=20) fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y-br por vía ip y grupos de 4 ratones fueron sacrificados a los días 6, 9, 15, 22, y 26pi, junto con un ratón no infectado. Se obtuvieron los esplenocitos, células de ganglio linfático inguinal, y leucocitos infiltrantes de hígado por gradiente de Percoll. Las células se tiñeron con Acs específicos para CD19, CD138, B220, FAS, GL7, CD5 y CD1d, y luego fueron adquiridas en un citómetro de flujo. En la Fig. se muestra un dot-plot representativo para cada tinción a cada día pi para (A) bazo, (D) ganglio linfático inguinal e (G) hígado. Inicialmente se realizó un "gate" en leucocitos totales, y se muestran las poblaciones CD19<sup>int</sup>CD138<sup>+</sup> (LiB totales) y CD19<sup>int</sup>CD138<sup>+</sup> (CP). Luego se realizó un "gate" en células CD19<sup>int</sup>B220<sup>+</sup> (LiB) y se muestra la expresión de FAS y GL7, seleccionando la población FAS<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup> correspondiente a LiB de CG. Por otro lado, en el "gate" de LiB se analizó la expresión de CD5 y CD1d, seleccionando la población CD5<sup>int</sup>CD1d<sup>+</sup>, correspondiente a la población descrita como B10 [149]. Un gráfico cinético muestra el porcentaje de LiB totales (rectángulos grises), o PL/CP (rectángulos vacíos rojos) dentro del total de leucocitos, y el porcentaje de células de CG (rectángulos con cruz turquesa) y de B10 (rectángulos con punto lila) dentro de la población de LiB en bazo (B), ganglio linfático inguinal (E) e hígado (H). Valores absolutos de las diferentes poblaciones de LiB en bazo, ganglio linfático inguinal e hígado se muestran en las Fig. C, F e I, respectivamente.

Muchos de los mecanismos regulatorios de la inmunidad celular descriptos, involucran la secreción de citoquinas anti-inflamatorias o regulatorias [14, 17-19, 31]. Con la intención de evaluar un posible rol regulatorio de LiB mediado por citoquinas, decidimos determinar la producción de citoquinas en la población de LiB durante la infección con *T. cruzi*. Medimos IL10 ya que es una conocida citoquina supresora [14, 17, 18]. También medimos LAP1 como indicador de la secreción de TGF $\beta$ , otra conocida citoquina supresora e inductora de Tregs [192-194] y también IL6, ya que en conjunto con TGF $\beta$ , esta citoquina es capaz de inducir la diferenciación de LiT hacia Th17 productores de IL17.

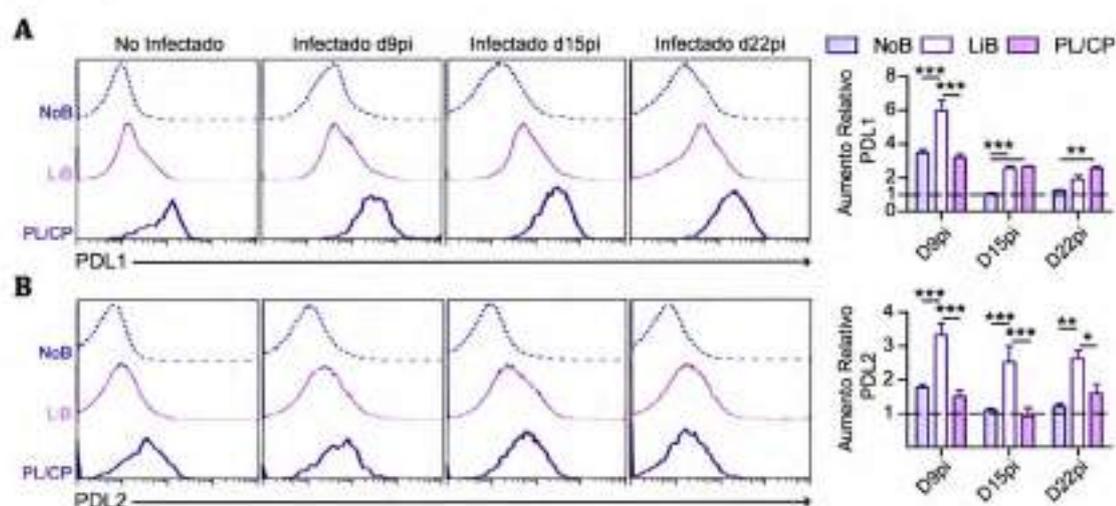


**Figura 10:** En la infección con *T. cruzi* los LiB secretaron IL10, TGF $\beta$  e IL6. Ratones WT (n=4) fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y-br y sacrificados al día 9pi. Los esplenocitos fueron obtenidos y cultivados durante 5h en presencia de Brefeldina A (para determinar IL6) o Monensina (para determinar IL10) o no (para determinar LAP1). Los esplenocitos fueron fijados y permeabilizados y teñidos con Acs contra CD19, B220, CD5, CD1d, CD138, IL10, IL17, LAP1, IL6. Se realizó un "gate" en la población CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>, definida como LiB totales, y se muestra un dot-plot representativo de cada citoquina. El "gate" indica la población que produce la citoquina seleccionada. De manera similar, se muestran los dot-plots representativos para cada citoquina indicando el porcentaje en la población CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup> (o B10), y en la población CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> que la produce. Se muestra para cada citoquina, un gráfico indicando el porcentaje de producción dentro de cada población determinada, para todos los animales del experimento. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.01 – Anova de una vía, Post Test de Bonferroni. Experimento representativo de 5.

Por medio de citometría de flujo intracelular, en el bazo de ratones infectados observamos que los LiB totales (definidos como CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) fueron capaces de secretar

IL10, TGF $\beta$ , e IL6. Los LiB secretores de IL10 estuvieron presentes en un mayor porcentaje (Fig. 10), y en segundo lugar, la población LAP1<sup>+</sup> (Fig. 10) indicativa de la secreción de TGF $\beta$ . Evidenciamos que, en concordancia a lo reportado [149], la población B10 presentó el mayor porcentaje de células productoras de IL10 (Fig. 10). Además, evidenciamos la capacidad, no reportada a la fecha, de esta población para secretar IL6 y TGF $\beta$ , dada la expresión positiva de LAP1 (Fig. 10). Finalmente determinamos que los PL/CP fueron capaces de secretar IL10 y TGF $\beta$  y sorprendentemente encontramos que un gran porcentaje de PL/CP produce IL6 (Fig. 10). Cabe señalar que los LiB de CG no producen ninguna de las citoquinas evaluadas (datos no mostrados).

Otros mecanismos regulatorios involucran el contacto intercelular, a través de diversos receptores expresados en superficie celular. En particular, la vía PD1/PDL1/PDL2 ha sido demostrada capaz de regular la proliferación y función efectora de LiT en varios modelos [189-191, 195, 196]. Es por ello que decidimos evaluar si los LiB de ratones infectados con *T. cruzi* eran capaces de expresar receptores de tipo inhibitorio tales como PDL1 y PDL2 y comparamos su expresión con la de LiB de ratones controles no infectados.



**Figura 11:** Los LiB y PL/CP expresaron PDL1 y PDL2 e incrementaron la expresión de PDL1 en respuesta a la infección con *T. cruzi*. Ratones WT (n=12) fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y-br y grupos de 4 ratones fueron sacrificados a los días 9, 15 y 22pi, junto con un ratón no infectado como control en cada día. Los esplenocitos de los ratones fueron obtenidos y teñidos con Abs específicos para CD19, B220, CD138, PDL1, y PDL2. En A) se muestran histogramas con la expresión de PDL1 en las poblaciones NoB (CD19<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>), de LiB (CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) y de PL/CP (CD19<sup>int</sup>CD138<sup>+</sup>) a cada día pi, junto con un gráfico del aumento relativo de la expresión del ligando (MFI de la población del ratón infectado/MFI de la población del no infectado). De manera análoga en B) se muestra la expresión de PDL2. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 – Anova de dos vías, Post Test de Bonferroni. Experimento representativo de 6.

En la Fig. 11 se muestra la expresión de PDL1 (Fig. 11A) y de PDL2 (Fig. 11B) en la población de células CD19<sup>B220</sup>CD138<sup>-</sup>, designada como NoB, en la población de LiB (CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) y en PL/CP (CD19<sup>int</sup>CD138<sup>+</sup>). En los ratones infectados con *T. cruzi*, las tres poblaciones analizadas mostraron un aumento en la expresión de PDL1. En la Fig. 11A es visible un aumento en la expresión relativa de PDL1 para cada población celular en el día 9pi, y para LiB y PL/CP a los días 15 y 22pi (Fig. 11A). Resultó llamativo que la población de LiB mostró una mayor expresión de PDL1 que la población NoB a todos los días pi evaluados, incluso en el animal no infectado (Fig. 11A). Sorprendentemente, la población de PL/CP presentó la mayor expresión de PDL1 (Fig. 11A).

Con respecto a la expresión de PDL2, se evidenciaron incrementos en la expresión de PDL2 sobretodo en la población de LiB en respuesta a la infección (Fig. 11B). La población de PL/CP también mostró la mayor expresión de este receptor, y los LiB presentaron una mayor expresión que la población NoB a todos los días pi considerados y en el animal no infectado (Fig. 11B).

Es importante señalar que para la determinación de la expresión de ambos ligandos, PDL1 y PDL2, en el animal no infectado, se procedió a la adquisición de una gran cantidad de eventos en el citómetro de flujo, asegurando que se viera una población CD138<sup>+</sup> para realizar el "gate" y posterior histograma. Esta población es escasa, prácticamente indetectable en un ratón normal, no infectado no inmunizado.

### **3.5] Los PL/CP generados en la infección con *T. cruzi* fueron capaces de regular las células secretoras de TNF e IFN $\gamma$ *in vitro* vía PDL1**

De acuerdo a los resultados mostrados hasta el momento, existiría una potencial capacidad regulatoria por parte de los LiB y de los PL/CP generados durante la infección con *T. cruzi*, ya que son capaces de producir citoquinas con reportada capacidad regulatoria negativa y expresan ligandos de receptores de tipo inhibitorio. Para demostrar si efectivamente los LiB o sus productos de diferenciación tienen capacidad supresora, realizamos un ensayo de co-cultivo *in vitro*. Trabajamos con esplenocitos de ratones WT infectados obtenidos en el día 13pi, ya que en este día comienza a regularse de manera negativa la producción de TNF en los animales WT infectados (Fig. 2E, Fig. 3A), situación que no ocurre en los ratones muMT. El dato sugiere que a los 13 días pi o próximo a él, los LiB y las células derivadas de su diferenciación podrían estar ejerciendo una función regulatoria.

El ensayo *in vitro* consistió en purificar, a partir de un "pool" de esplenocitos de ratones WT infectados, la fracción de LiB y el remanente de esplenocitos sin LiB, que denominamos células NoB. Los LiB se obtuvieron por medio de un kit de selección negativa que utiliza Acs adosados a perlas magnéticas específicos para CD43 (ausente en LiB y presente en el resto de las poblaciones celulares). Se obtuvo la fracción NoB (CD43<sup>+</sup>, con menos de un 3% de contaminación de LiB) y la fracción de LiB (82% de pureza controlado por la expresión de CD19 y B220). En la fracción de LiB se encontraron PL/CP contaminantes. Las fracciones se cultivaron solas o en conjunto en una proporción 1:1, en presencia o ausencia de Ags del *T. cruzi* (AgTpY), durante 48h y en el sobrenadante de cultivo se cuantificaron, por ELISA, las citoquinas TNF, IFN $\gamma$ , e IL10.

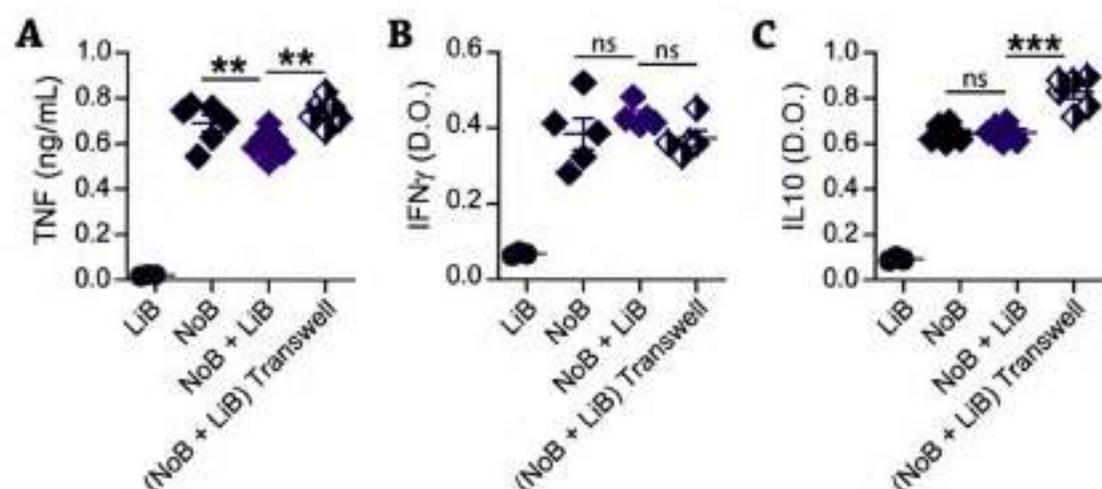
En las muestras de las fracciones celulares individuales o en conjunto cultivadas sin AgTpY se detectó una muy baja o nula secreción de citoquinas (datos no mostrados), por lo cual de aquí en adelante se muestran los resultados de los cultivos con AgTpY.

Observamos que los LiB cultivados en presencia de AgTpY no secretaron las citoquinas evaluadas, mientras que la fracción NoB fue capaz de secretar TNF, IFN $\gamma$ , e IL10 (Fig. 12A, B, C; círculos grises y rombos azules llenos, respectivamente). Cuando a la fracción NoB se le agregaron LiB (co-cultivo NoB+LiB) la secreción de TNF se vio significativamente disminuida con respecto a la secreción de la fracción NoB cultivada solamente con AgTpY (Fig. 12A, comparar rombos azules con violetas). En contraparte, detectamos similares cantidades de IFN $\gamma$  y de IL10, con respecto a la fracción NoB sola (Fig. 12B, C), sugiriendo que los LiB o sus productos de diferenciación pueden controlar a la población productora de TNF pero no de IFN $\gamma$  o IL10.

Para discernir si el efecto supresor podría estar mediado a través de la secreción de citoquinas, o por medio del contacto intercelular incluimos en el ensayo de co-cultivo un transwell. El transwell que elegimos es una membrana porosa, cuyos poros son permeables para moléculas de pequeño tamaño (tales como citoquinas), pero impiden el contacto celular; de esta forma, las citoquinas secretadas por los LiB ubicados de un lado, serían capaces de llegar a la fracción NoB, pero los receptores de superficie de los LiB no podrían entrar en contacto con receptores de las células de la fracción NoB.

Pudimos observar que la concentración de TNF en el sobrenadante del co-cultivo separado por el transwell fue significativamente mayor a la presente en el sobrenadante del co-cultivo sin separación (Fig. 12A, rombos azules semillenos). Esto sugiere que la ausencia de contacto entre las células por la presencia del transwell hace perder el efecto inhibitorio observado en el co-cultivo. Por otra parte, presentó similares niveles de IFN $\gamma$  (Fig. 12B). Con respecto a la IL10, sorprendentemente observamos que el agregado de LiB

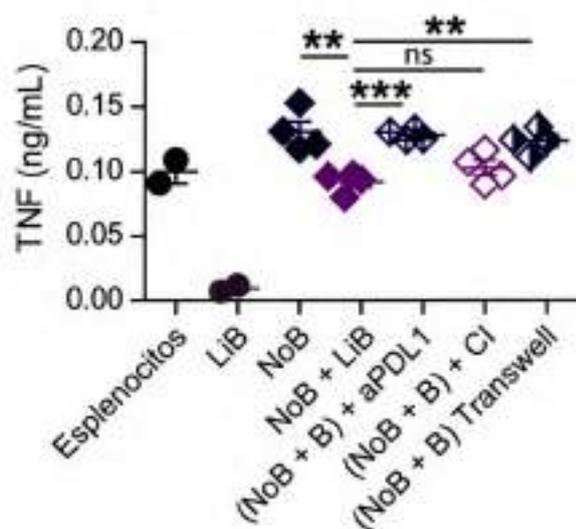
a la fracción de células NoB no modifica la producción de esta citoquina, pero si estas poblaciones estaban separadas por el transwell las células secretan significativamente mayor concentración de IL10 (Fig. 12C). En conjunto estos resultados indican que los LiB serían capaces de regular a las poblaciones secretoras de TNF en el resto de las poblaciones celulares esplénicas, y que lo harían a través de un mecanismo dependiente del contacto celular.



**Figura 12:** Los LiB fueron capaces de regular *in vitro* a células secretoras de TNF a través de un mecanismo dependiente de contacto celular. Ratones WT ( $n=4$ ) fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y-br y sacrificados al día 13pi. Los esplenocitos fueron obtenidos y utilizando Ac específicos para CD43 adosados a perlas magnéticas se obtuvo: la fracción de LiB (CD43<sup>-</sup>) y la fracción celular NoB (CD43<sup>+</sup>). Cada fracción fue cultivada por separado o juntas (co-cultivo) en proporciones 1:1 en ausencia o presencia de un Transwell. Todos los cultivos se realizaron en presencia de Ags del *T. cruzi* (AgTpY). Luego de 48h de cultivo, los sobrenadantes fueron obtenidos y los niveles de TNF (A), IFN $\gamma$  (B) o IL10 (C) fueron evaluados por ELISA. \*\* $p<0,01$  \*\*\* $p<0,001$  Anova de una vía de muestras repetidas con post-Test de Bonferroni. Experimento representativo de 4.

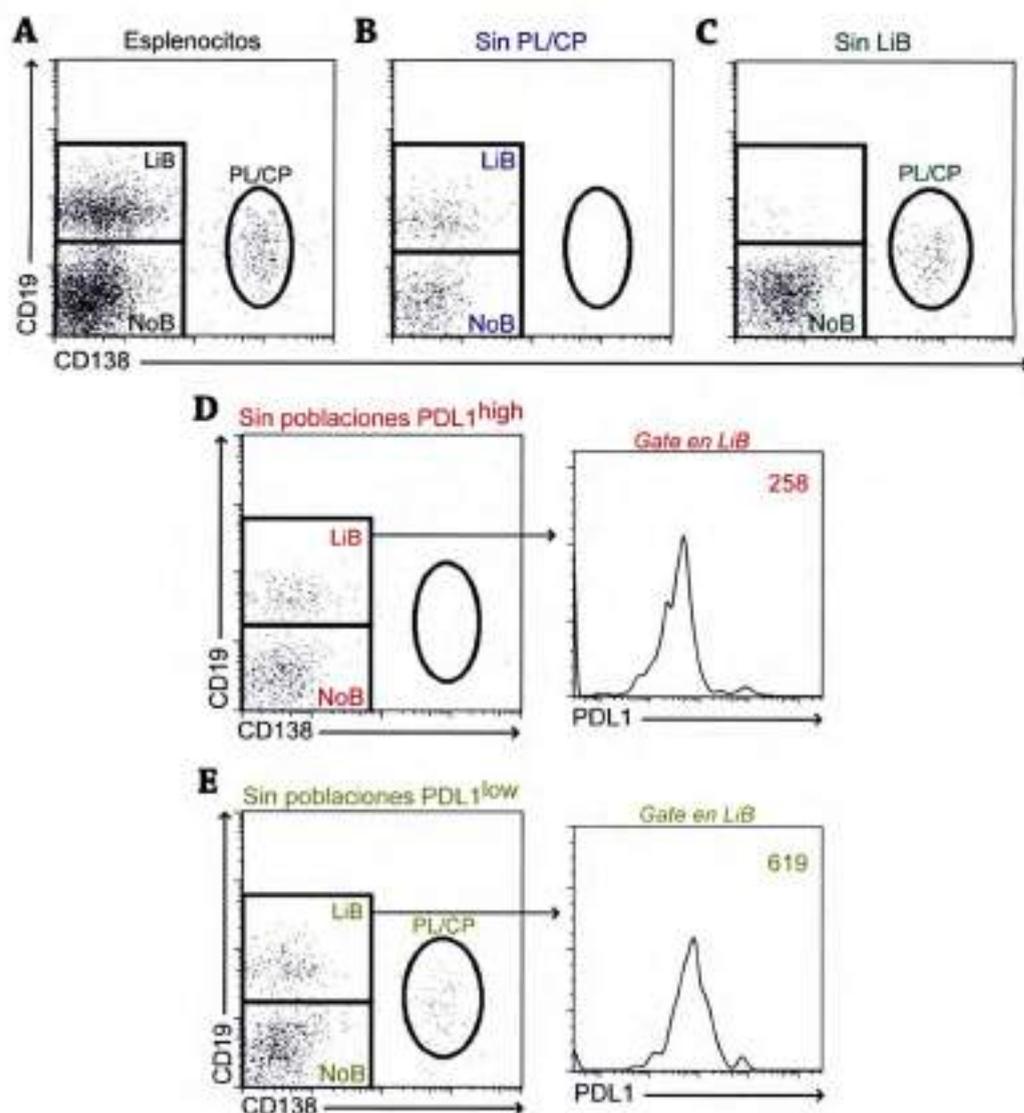
Para evaluar si la inhibición ejercida por la población de LiB sobre la producción de TNF era mediada por PDL1, realizamos el mismo ensayo *in vitro* pero incubando las células del co-cultivo con un Ac específico para PDL1, el cual bloquea la interacción de PDL1 con sus posibles receptores. En la Fig. 13 observamos que el sobrenadante del cultivo que contiene a la fracción NoB+LiB poseía un nivel de TNF significativamente menor al sobrenadante de la fracción NoB (Fig. 13, rombos violetas llenos versus azules llenos). Estos resultados son concordantes con el experimento descrito anteriormente. Además, observamos que cuando incorporamos al co-cultivo un Ac específico para PDL1, la concentración de TNF en el sobrenadante de cultivo aumentó significativamente, alcanzando valores de concentración similares a la fracción NoB incubada con el Ag; de manera análoga, la concentración de TNF aumentó significativamente en el sobrenadante del co-cultivo separado por un transwell en comparación al co-cultivo NoB+LiB (Fig. 13, rombos azules con cruz versus rombos violetas llenos, y rombos azules semi-llenos versus

rombos violetas llenos). Cuando al co-cultivo se le agrega un Ac control, llamado control de isotipo (CI), que no reconocería nada en el sistema pero posee las mismas características que el Ac específico para PDL1, vemos que la cantidad de TNF en el sobrenadante es similar a la producida por el co-cultivo NoB+LiB (Fig. 13, rombos violetas vacíos versus rombos violetas llenos). Este resultado sugiere que la vía PD1/PDL1 estaría involucrada en la regulación de células productoras de TNF ejercida por células del linaje B.



**Figura 13:** La vía PD1/PDL1 fue capaz de regular *in vitro* la secreción de TNF. Ratones WT (n=4) fueron infectados con *T. cruzi* cepa Y-br y sacrificados al día 13pi. Los esplenocitos fueron obtenidos y sometidos a la purificación con Acs específicos para CD43 unidos a perlas magnéticas. Se obtuvo la fracción de LiB (CD43<sup>+</sup>) y la fracción celular NoB (CD43<sup>-</sup>). Se cultivó cada fracción por separado o en un co-cultivo en proporciones 1:1. A este co-cultivo se adicionaron además Acs bloqueantes para PDL1 o su respectivo control de isotipo (CI), y por otro lado, un Transwell con poros de 0,2µm que impide el contacto celular entre las fracciones. Todos los cultivos fueron realizados en presencia de Ags del *T. cruzi* (AgTpY). Luego de 48h de cultivo, se obtuvieron los sobrenadantes para la determinación de TNF por ELISA. \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 Anova de una vía de muestras repetidas con post-Test de Bonferroni. Experimento representativo de 2.

Previamente mostramos que la población de LiB, y en particular los PL/CP, son los leucocitos esplénicos que presentan la mayor expresión de PDL1 durante la infección con *T. cruzi*; y considerando que en la fracción de LiB contenía PL/CP, nos preguntamos cuál de las dos poblaciones, si los LiB o los PL/CP, tendría mayor potencial regulatorio, y cuán influyente es la expresión de PDL1 sobre dicha función. Para ello diseñamos otro experimento *in vitro*, en el que de manera similar al experimento anterior, cultivamos esplenocitos totales en presencia de AgTpY durante 48 h. El valor de TNF detectado en este sobrenadante de cultivo fue considerado como valor de referencia. Además cultivamos, en las mismas condiciones experimentales, esplenocitos en los que a través de cell sorting eliminamos LiB, PL/CP, o células con alta expresión de PDL1 (PDL1<sup>high</sup>) o células con baja expresión de PDL1 (PDL1<sup>low</sup>).



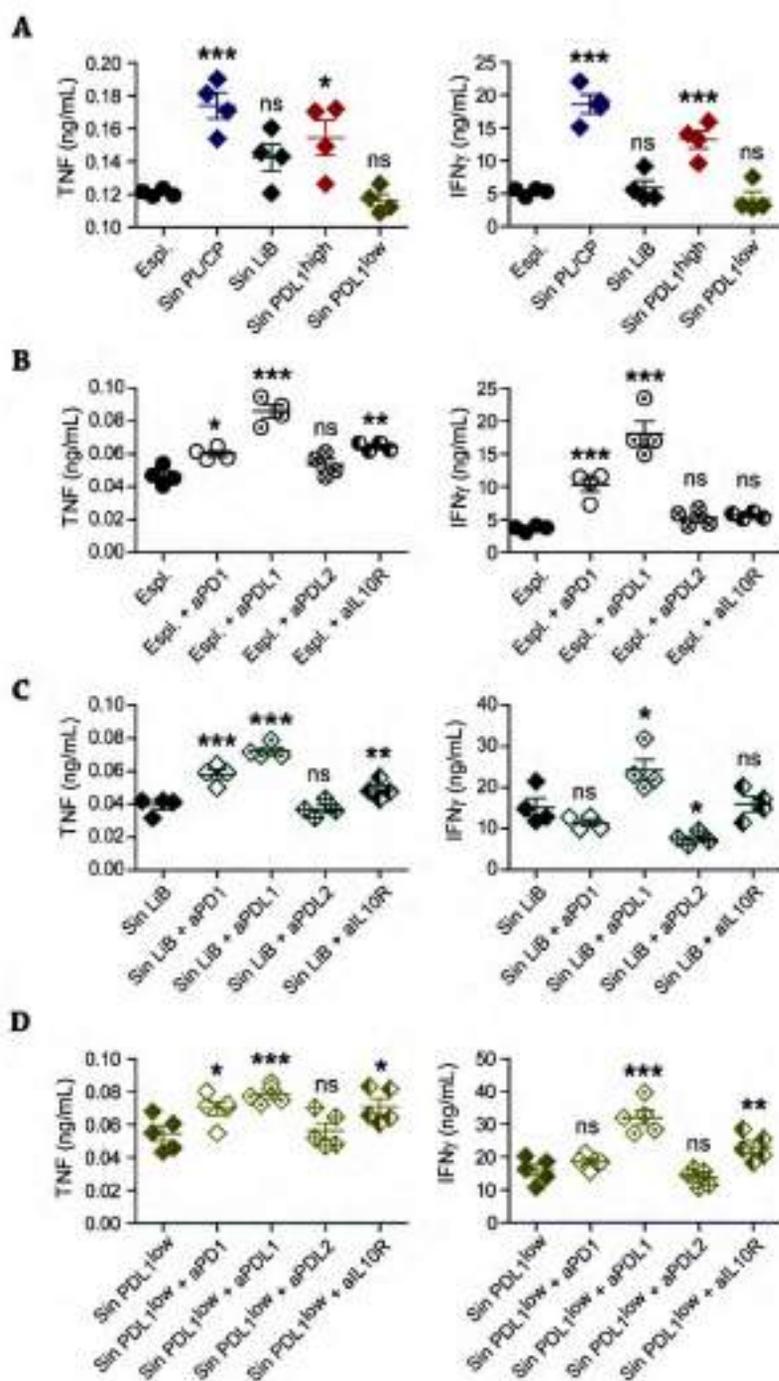
**Figura 14:** Poblaciones celulares presentes en esplenocitos de ratones infectados con *T. cruzi* post-depleción de LiB, PL/CP o PDL1<sup>high</sup> y PDL1<sup>low</sup>. Ratones WT (n=4) fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y-br y sacrificados al día 13pi. Sus esplenocitos fueron obtenidos, teñidos con Acs específicos para CD19, B220, CD138, y PDL1, y procesados para eliminación de subpoblaciones específicas por cell sorting. En A) se muestra un dot plot representativo de los esplenocitos totales previo al sort. (B) Dot plot representativo de la composición de esplenocitos post-sort excluyendo PL/CP. (C) Dot plot representativo del post-sort excluyendo LiB. (D) Dot plot representativo de la población de esplenocitos post-sort sin poblaciones PDL1<sup>high</sup>. (E) Dot plot representativo del post-sort de esplenocitos sin poblaciones PDL1<sup>low</sup>. Los histogramas muestran la IFM correspondiente a PDL1 en la población de LiB remanente.

En la Fig. 14A se puede observar la composición de los esplenocitos iniciales del ratón WT infectado: se distingue la población de LiB (CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>), la población de células NoB (definidas ahora como CD19<sup>+</sup>CD138<sup>-</sup>) y PL/CP (CD19<sup>int</sup>CD138<sup>+</sup>). Luego de la purificación por cell sorting, se obtuvieron diferentes conjuntos de poblaciones, correspondientes a esplenocitos sobre los que se eliminó una determinada población.

Cuando se eliminaron los PL/CP de la población de esplenocitos, en la Fig. 14B se observa que la muestra celular está compuesta por células CD19<sup>+</sup> (LiB) y por células CD19<sup>-</sup>CD138<sup>-</sup> (NoB) y la población CD19<sup>int</sup>CD138<sup>+</sup> (PL/CP) se encuentra ausente. En la Fig. 14C podemos observar la composición de la población de esplenocitos luego de la eliminación por cell sorting de LiB CD19<sup>+</sup>; se pueden visualizar células CD19<sup>-</sup>CD138<sup>-</sup> (NoB), PL/CP (CD19<sup>int</sup>CD138<sup>+</sup>) y la ausencia de la población de LiB (CD19<sup>+</sup>). En la Fig. 14D se muestra la composición celular de los esplenocitos post-sort de la eliminación de células PDL1<sup>high</sup>, en donde se aprecia la presencia de células NoB (CD19<sup>-</sup>CD138<sup>-</sup>) y de la población de LiB PDL1<sup>low</sup> (CD19<sup>+</sup>; IFM=258) y se observa la ausencia de los PL/CP, las cuales, como previamente mostramos, expresan los más altos niveles de PDL1. En contraparte, cuando los esplenocitos fueron desprovistos de la población PDL1<sup>low</sup> se observan las poblaciones NoB (CD19<sup>-</sup>CD138<sup>-</sup>), PL/CP (CD19<sup>int</sup>CD138<sup>+</sup>) y LiB (CD19<sup>+</sup>) que expresen niveles altos de PDL1 (IFM= 619) (Fig. 14E).

Cabe destacar que para todas las muestras celulares y de esplenocitos se determinó el porcentaje final de la fracción NoB, es decir en la composición post-sort, y se colocó en todas las condiciones de cultivo la misma cantidad de células correspondientes a la fracción NoB. De esta forma los niveles de TNF en el sobrenadante de cultivo serían producidos por una misma cantidad de células NoB, en el mismo volumen final, que se encuentran en presencia o ausencia de determinadas subpoblaciones de LiB.

Tal como indicamos, los esplenocitos (completos) o esplenocitos desprovistos de las distintas poblaciones celulares fueron cultivados durante 48h en presencia de AgTpY, y la concentración de TNF e IFN $\gamma$  fue determinada en los sobrenadantes de cultivo, por ELISA. Detectamos que hubo un aumento estadísticamente significativo en los niveles de TNF cuando la población de PL/CP fue eliminada de la población de esplenocitos totales (Fig. 15A). Este aumento también lo presentó la muestra celular sin células PDL1<sup>high</sup> (Fig. 15A); mientras que no hubo diferencias significativas en las concentraciones de TNF en los sobrenadantes de los cultivos del conjunto de poblaciones sin LiB y sin PDL1<sup>low</sup> (Fig. 15A). Este comportamiento también se observó cuando se evaluó la producción de IFN $\gamma$ , en donde los esplenocitos sin PL/CP o sin células PDL1<sup>high</sup> produjeron significativamente mayor cantidad de IFN $\gamma$  que los esplenocitos totales; mientras que los esplenocitos sin LiB o sin células PDL1<sup>low</sup> no presentaron diferencias con respecto a los esplenocitos totales (Fig. 15A). Estos datos, analizados en conjunto, sugieren que los PL/CP y posiblemente también los LiB PDL1<sup>high</sup> estarían controlando a células productoras de TNF y de IFN $\gamma$  específicas de Ag del *T. cruzi*.



**Figura 15:** Los PL/CP fueron capaces de regular células secretantes de TNF e IFN $\gamma$  presentes en esplenocitos de ratones WT infectados. Ratones WT (n=4) fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y-br y sacrificados al día 13pi. Sus esplenocitos fueron obtenidos, teñidos con Acs específicos para CD19, B220, CD138, y PDL1, y procesados para depleción de células específicas por cell sorting. Se realizaron cultivos de 48h en presencia de AgTpY con las poblaciones celulares descritas en la Fig. 14. "Esplenocitos" (negro): Población NoB + LIB + PL/CP. "Sin PL/CP" (azul): Población NoB + LIB. "Sin LIB" (verde): Población NoB + PL/CP. "Sin PDL1<sup>high</sup>" (rojo): Población NoB + LIB PDL1<sup>high</sup>. "Sin PDL1<sup>low</sup>" (amarillo): Población NoB + LIB PDL1<sup>low</sup> + PL/CP. En todos los casos se determinó el porcentaje de la fracción NoB, para calcular el número de células a colocar en cada caso. En los sobrenadantes de cultivo se determinó la concentración de TNF y de IFN $\gamma$  (A) por ELISA. B) Los esplenocitos y los conjuntos purificados C) "Sin LIB" y D) "Sin PDL1<sup>low</sup>" fueron cultivados en presencia de Acs específicos bloqueantes para PD1, PDL1, PDL2 e IL10R. Los niveles de TNF e IFN $\gamma$  fueron determinados en el sobrenadante de cultivo por ELISA. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 Anova de muestras repetidas con post test de Dunett. Controles: (A-B) Esplenocitos, (C) Sin LIB y (D) Sin PDL1<sup>low</sup>.

Dado que observamos que la vía PD1/PDL1 estaría involucrada en la regulación de TNF, decidimos realizar nuevamente un ensayo de bloqueo con Acs anti PDL1 sobre las poblaciones desprovistas de poblaciones celulares particulares y que contuvieran o no a las potenciales poblaciones regulatorias; es decir, esplenocitos sin LiB o sin células PDL1<sup>hi</sup>. De esta manera, incorporamos al cultivo Acs bloqueantes para PD1, PDL1, y PDL2, para así también determinar si PDL2 juega algún rol en este sistema regulatorio. Además, incorporamos un Ac específico para el receptor de IL10 (IL10R), para evaluar si IL10 está involucrada también en el mecanismo regulatorio de manera indirecta, ya que previamente mencionamos que era necesario el contacto celular para que ocurra la supresión (Fig. 12A y 13). Recordemos que los LiB de ratones infectados con *T. cruzi* no secretan grandes cantidades de IL10 en presencia del AgTpY en comparación a la fracción NoB (Fig. 12C), pero la fuente de IL10 dentro del sistema puede provenir de otras poblaciones celulares, incluso de aquellas reguladas por la vía PD1-PDL1.

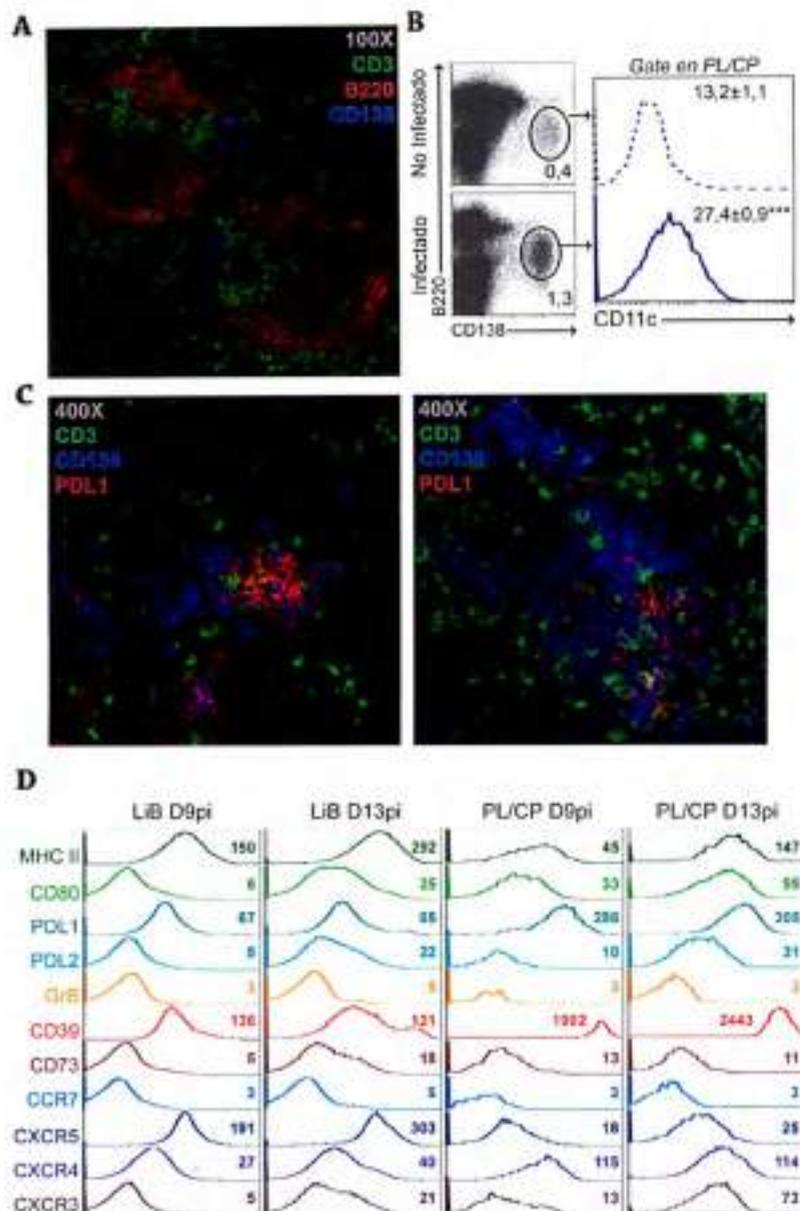
En la evaluación de la vía PD1/PDL1/PDL2, encontramos que los niveles de TNF y de IFN $\gamma$  se vieron significativamente incrementados con la adición de tanto un Ac específico para PD1 como para PDL1, mientras que no se observaron cambios con la incorporación de un Ac específico para PDL2 (Fig. 15B). El agregado de un Ac específico para IL10R hizo que aumentara de manera significativa la secreción de TNF por parte de este conjunto de poblaciones, mientras que no alteró la producción de las células secretantes de IFN $\gamma$  (Fig. 15B).

Por otra parte, cuando evaluamos el conjunto de poblaciones desprovistas de LiB observamos que las concentraciones de TNF, en el sobrenadante de este cultivo, incrementaron de manera significativa con el agregado de un Ac específico para PD1 y también con el de un Ac específico para PDL1 (Fig. 15C). No observamos modificaciones en la producción de TNF incorporando un Ac específico para PDL2 (Fig. 15C). Con respecto a la producción de IFN $\gamma$ , observamos que la adición de un Ac específico para PD1 al cultivo no produjo modificaciones en la concentración de esta citoquina, sin embargo, el agregado de un Ac específico para PDL1 generó un incremento en la secreción de IFN $\gamma$  por parte del conjunto de poblaciones sin LiB (Fig. 15C). Llamativamente, el cultivo de estas poblaciones junto con un Ac específico para PDL2 provocó una disminución significativa en la producción de IFN $\gamma$  (Fig. 15C). Cuando un Ac específico para IL10R fue agregado al cultivo de estas poblaciones, observamos un aumento significativo en los niveles de TNF pero no observamos cambios en la concentración de IFN $\gamma$ , respecto de los niveles de ambas citoquinas en el sobrenadante de cultivo de las poblaciones con AgTpY (Fig. 15C).

Por último, evaluamos qué sucedía con el agregado de estos Acs a las poblaciones celulares sin células PDL1<sup>low</sup>. Hallamos que la adición de Acs específicos para IL10R, PD1 y PDL1 desencadenó un aumento significativo en la concentración de TNF en el sobrenadante de cultivo de estas poblaciones, mientras que el agregado de un Ac específico para PDL2 no genera ningún cambio en la concentración de TNF, con respecto al cultivo sin Acs bloqueantes (Fig. 15D). Con respecto al IFN $\gamma$ , secretado en el cultivo de estas poblaciones, pudimos determinar que la adición de un Ac específico para IL10R o para PDL1 indujo un aumento significativo en la concentración de esta citoquina en el sobrenadante de cultivo (Fig. 15D). No encontramos diferencias en los niveles de IFN $\gamma$  en los cultivos en los que incorporamos Acs específicos para PD1 o PDL2 (Fig. 15D).

Los resultados presentados hasta el momento nos indican que los PL/CP estarían cumpliendo un rol regulatorio en la infección por *T. cruzi* y que ejercen dicha función a través de la vía PD1-PDL1. Dada la originalidad e importancia del hallazgo, decidimos estudiar más profundamente a éstas células en cuanto a su ubicación en el bazo de ratones infectados como a sus características fenotípicas.

En primer lugar, realizamos un ensayo de inmunofluorescencia sobre cortes de bazo de un animal infectado para determinar la localización de los PL/CP; quisimos evaluar si tienen una ubicación EF o se encuentran en pulpa roja. La ubicación de los PL/CP nos puede orientar respecto de su origen y permitimos inferir si provienen de CG o no. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio utilizando el modelo de infección con *T. cruzi*, pero con la cepa Tulahuén, establecieron que los PL/CP esplénicas aparecen en los ratones infectados antes de la aparición de CG (como ocurre también en el modelo utilizado en esta tesis, Fig. 9A, B, C, D, E, F) y que se ubican en focos EF. En la Fig. 16A se muestra una fotografía de microscopía de fluorescencia de un corte de bazo de ratón infectado en donde se puede observar a los LiB (B220<sup>+</sup>, en rojo) organizados en folículos y la zona de LiT (CD3<sup>+</sup>, en verde). Los LiT se ubican por fuera de los folículos aunque también se observan unos pocos LiT dentro del folículo, correspondiente posiblemente a los Li Tfh. Los PL/CP (CD138, azul) se encontraron agrupadas fuera del folículo, de ahí su nombre extrafoliculares, y se observó que están en contacto con LiT (Fig. 16A). Ha sido reportado además que la población de PL/CP EF co-expresan el receptor de superficie CD11c [197]. Por citometría de flujo, determinamos que los PL/CP CD138<sup>+</sup> de ratones infectados con *T. cruzi* también expresan CD11c y que estas células aumentaron de manera significativa (datos no mostrados) la IFM de CD11c al día 13pi (Fig. 16B). Además, determinamos que la expresión de PDL1 co-localiza con los PL/CP EF, aunque al contrario de lo que observamos por citometría de flujo no todas las células CD138<sup>+</sup> expresan PDL1 (Fig. 16C).



**Figura 16:** Las PL/CP de ratones infectados con *T. cruzi* se ubicaron en focos EF, expresan CD11c, PDL1 y otras receptores asociados a funciones regulatorias como PDL2 y CD39. Ratones WT (n=6) fueron infectados con trópomastigotes de *T. cruzi* cepa Y-br en grupos de 3 animales, con diferencia de 4 días, y sacrificados todos el mismo día junto con 2 ratones WT no infectados. Una porción del bazo de los animales del día 13pi se procesó para inmunofluorescencia (IF), y el resto de los bazos se procesaron para obtener esplenocitos totales. Los esplenocitos fueron teñidos con Acs específicos para CD19, CD138, CD11c, B220, MHCII, CD80, PDL1, PDL2, GrB, CD139, CD73, CCR7, CXCR5, CXCR4, CXCR3 y adquiridos en un citómetro de flujo. (A) Fotografía de IF de un corte de bazo teñido con Acs específicos para B220 (rojo), CD3 (verde) y CD138 (azul) – 100X. (B) Dot plots representativos de citometría de flujo donde se muestra el gate realizado en la población CD19<sup>int</sup>CD138<sup>+</sup> correspondiente a PL/CP en animales no infectados e infectados al día 13pi, junto con un histograma CD11c para las correspondientes poblaciones de PL/CP. Se indica la IFM junto con el desvío estándar del grupo; \*\*\*p<0.01 Test t de Student. (C) Fotografía de IF de un corte de bazo teñido con Acs específicos para CD3 (verde), CD138 (azul) y PDL1 (rojo) – 400X. (D) Histogramas de expresión de MHCII, CD80, PDL1, PDL2, GrB, CD39, CD73, CCR7, CXCR5, CXCR4, CXCR3 en la población de LiB (gate realizado en CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) y en la población de PL/CP (CD19<sup>int</sup>CD138<sup>+</sup>) de esplenocitos de ratones con 9 y 13 días de infección. Experimento representativo de 2.

Finalmente, por citometría de flujo medimos en los PL/CP la expresión de otros receptores celulares. Decidimos evaluar receptores asociados a presentación antigénica, tales como MHCII, CD80; moléculas asociadas a funciones regulatorias, como PDL1, PDL2, GrB, CD39, CD73 y receptores asociados a migración celular como CCR7, CXCR5, CXCR4, CXCR3. Comparamos la expresión de estas moléculas de superficie de los PL/CP con la expresión de las mismas en LiB de ratones, con 9 y 13 días pi. Observamos que los PL/CP del día 9 y 13pi presentaron una menor expresión de MHCII y una mayor expresión de CD80 que sus correspondientes LiB, y a su vez los PL/CP del día 13pi presentaron una mayor expresión de ambas proteínas con respecto a los PL/CP del día 9pi (Fig. 16D). Con respecto a las moléculas de superficie asociadas a un perfil regulatorio, hallamos que los PL/CP del día 9 y 13pi presentaron, tal como mostramos en la Fig. 11, una mayor expresión de PDL1 y PDL2 que sus correspondientes LiB, siendo los PL/CP del día 13pi las que presentaron la mayor expresión (Fig. 16D). No detectamos expresión positiva para GrB (FMO= 3) (Fig. 16D). Sorprendentemente, tanto los LiB como los PL/CP expresaron la ectoenzima CD39, y aún más llamativo fue el hecho que los PL/CP aumentaron la expresión de esta molécula de manera muy marcada, presentando los más altos niveles en el día 13pi (Fig. 16D). En contraposición, LiB y PL/CP mostraron una leve expresión de CD73 (FMO=3); PL/CP del día 9pi mostraron un leve aumento con respecto a sus correspondientes LiB, y PL/CP del día 13pi, presentaron una leve disminución con respecto a los LiB (Fig. 16D). Por último, observamos que ni los LiB ni los PL/CP expresaron CCR7 (FMO=3) (Fig. 16D). Por otra parte, PL/CP del día 9 y 13pi presentaron una disminución en la IFM de CXCR5 y CXCR4 con respecto a LiB, sin grandes diferencias entre ellas (Fig. 16D). Finalmente, los PL/CP mostraron una mayor expresión de CXCR3 con respecto a los LiB obtenidos en el mismo día pi, y a su vez, los PL/CP del día 13pi presentaron un aumento en la expresión de este receptor con respecto a PL/CP obtenidas el día 9pi (Fig. 16D).

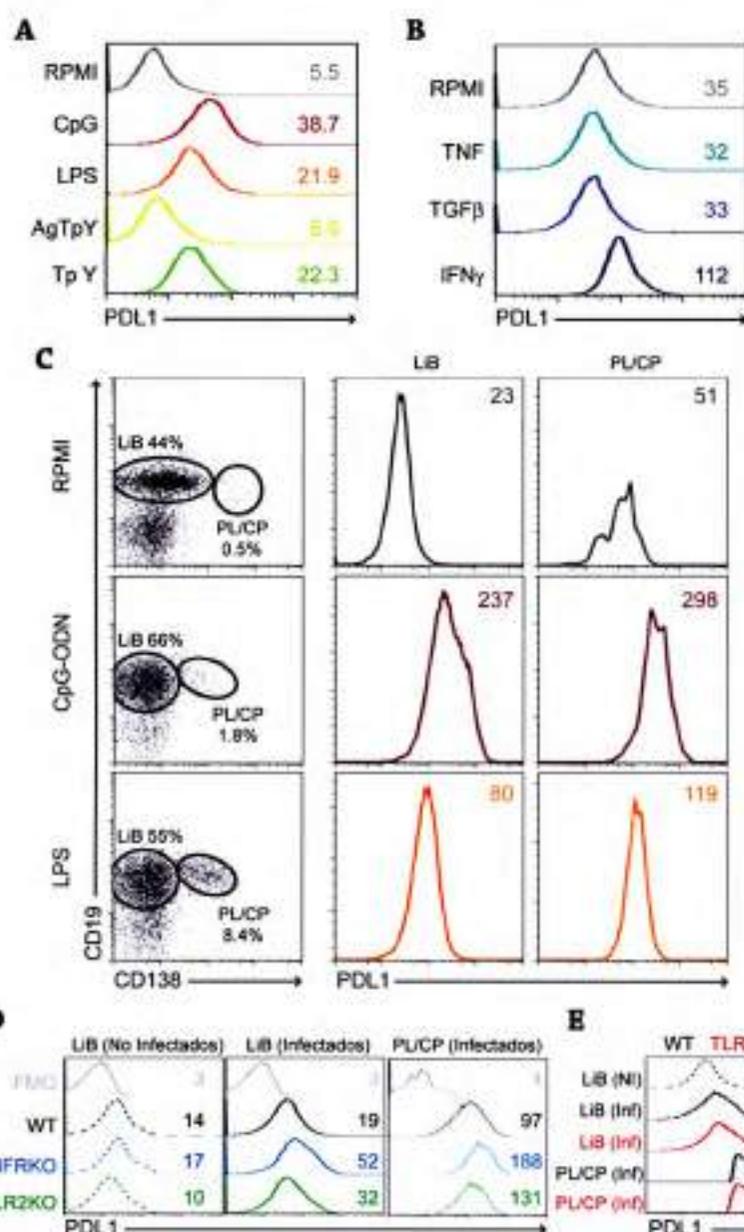
Debido a que PDL1 es una molécula que cumple una función clave en la capacidad regulatoria de los PL/CP decidimos investigar qué señales gobiernan la expresión de este receptor en los LiB. Dilucidar las señales que disparan la inducción de PL/CP PDL1<sup>+</sup> no solo es importante para identificar los mecanismos de la generación de estas células *in vivo*, para luego poder manipularlas, sino que nos permitiría generar estas células *in vitro* para disponer de un número elevado de células y evaluar su función regulatoria *in vivo*. La necesidad de contar con un alto número de PL/CP *in vitro* para ensayos de transferencia celular se debe a que el número de éstas células es escaso y que además son poco viables luego de obtenerlas por "cell sorting" (experiencia obtenida en el desarrollo de esta tesis). Además este tipo de ensayos nos permitiría determinar si la alta expresión de PDL1 en

PL/CP ocurre solo como consecuencia de la infección con *T. cruzi*, o si estas células podían ser inducidas en otro contexto.

Decidimos evaluar el efecto de diferentes tipos de moléculas, presentes en la infección, que pueden actuar sobre los LiB. Evaluamos ligandos que pueden actuar a través de TLRs (ya que los LiB poseen receptores de respuesta innata), o que actúan sobre el BCR, como AgTpY (que nos permitiría dilucidar si estas células se generan como consecuencia de una respuesta específica) o tripomastigotes de *T. cruzi* vivos (los cuales producen cambios en la sialidación de moléculas de la superficie de los LiB [31], o también diferentes citoquinas, las que pueden estar presentes en el microambiente esplénico. Para ello, LiB fueron incubados con los diferentes estímulos durante 24h y luego fue evaluada la expresión de PDL1 sobre los LiB por citometría de flujo. En la Fig. 17A se puede observar que tanto CpG-ODN, como LPS o los tripomastigotes vivos indujeron un aumento en la expresión de PDL1 en los LiB, respecto de LiB cultivados sin estímulo (sólo con medio de cultivo RPMI) (Fig. 17A). CpG-ODN promovió la mayor expresión de PDL1, mientras que LPS y los tripomastigotes vivos indujeron una menor expresión y semejante entre sí (Fig. 17A). Los AgTpY no fueron capaces de inducir un incremento en la expresión de PDL1 (Fig. 17A). Con respecto a las citoquinas, observamos que sólo IFN $\gamma$  fue capaz de incrementar la IFM de PDL1 en los LiB purificados, mientras que TNF y TGF $\beta$  no tuvieron efecto (Fig. 17B). Un punto importante a destacar es que en 24h, con los estímulos estudiados, no se generaron células con características de PL/CP (dato no mostrado), por lo tanto la expresión de PDL-1 que determinamos solo estuvo circunscripta a LiB.

En función de este dato, realizamos un cultivo similar al anterior pero cultivamos las células durante 72h para dar lugar a que los LiB se diferencien a PL/CP. En la Fig. 17C se muestra un dot plot representativo de la expresión de CD19 vs CD138 en las células luego del cultivo con cada estímulo. Se puede observar que LPS fue el estímulo que indujo un mayor porcentaje de PL/CP, y que si bien CpG-ODN induce PL/CP, el porcentaje es significativamente menor al que induce LPS (Fig. 17C) (LPS: 8,8% $\pm$ 0,4%, CpG: 2,1% $\pm$ 0,1%; \*\* $p$ <0.01 Test t de Student). Como era de esperar, la ausencia de estímulo (sólo medio de cultivo RPMI) no dispara la diferenciación de LiB a PL/CP (Fig. 17C). Observamos, que los PL/CP generadas bajo ambas condiciones de cultivo incrementaron la expresión de PDL1 con respecto a los LiB cultivados en la misma condición y que CpG-ODN, a pesar de inducir un menor porcentaje de PL/CP, disparó la mayor expresión de PDL1 (Fig. 17C). Los resultados obtenidos indican que PL/CP con alta expresión de PDL1 se podrían generar tanto en la infección con *T. cruzi* como frente a infecciones donde los microorganismos expresen ligandos de TLR4 y TLR9. No obstante, el número de

PL/CP que se genera *in vitro* es muy escaso para poder utilizar este tipo de ensayos como fuente de PL/CP para experimentos de transferencia celular *in vitro* o *in vivo*.



**Figura 17: PDL1 se indujo en LIB a través de ligandos de Toll, el *T. cruzi* e *IFNγ*.** Ratones WT (n=4) fueron sacrificados y sus esplenocitos fueron obtenidos. La fracción de LIB (CD43<sup>+</sup>), obtenida por selección negativa frente a Acs anti-CD43 unidos a perlas magnéticas, se cultivó durante 24h en presencia de diferentes estímulos. Luego las células se incubaron con Acs anti CD19, B220 y PDL1 marcados con fluorocromos y se analizaron por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de la expresión de PDL1 en el "gate" de LIB (CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) en presencia de A) estímulos mitógenos o B) de citoquinas. Se indica la IFM para cada estímulo. Experimento representativo de 4. En C) los LIB fueron cultivados en presencia o ausencia de CpG-ODN [1µg/mL] o de LPS [5µg/mL] durante 72h. Luego las células fueron

incubadas con Acs específicos para CD19, CD138 y PDL1 marcados con fluorocromos y se analizaron por citometría de flujo. Se muestra un dot-plot representativo mostrando la proporción de LIB y de PL/CP generadas frente a cada estímulo, y un histograma mostrando la expresión de PDL1 en cada población, indicando la IFM. En D) Ratones WT (n=5), TNFRKO (n=5) y TLR2KO (n=5) fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y-br y sacrificados al día 13pi, junto con ratones no infectados de cada cepa. Sus esplenocitos fueron obtenidos y teñidos con Acs anti-CD19, B220, CD138, y PDL1 marcados con fluorocromos y se analizaron por citometría de flujo. Se muestra un histograma representativo de LIB (CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) y PL/CP (CD19<sup>int</sup>CD138<sup>+</sup>) en cada cepa de ratón mostrando la expresión de PDL1 e indicando la IFM. FMO: control de fluorescencia para PDL1, conteniendo todos los Acs excepto anti-PDL1. E) Ratones WT (n=5), y TLR4KO (n=5) fueron infectados con *T. cruzi* y sacrificados al día 15pi. Sus esplenocitos fueron obtenidos y teñidos con Acs anti-CD19, B220, CD138 y PDL1 marcados con fluorocromos y se analizaron por citometría de flujo. Se muestra un histograma representativo de LIB (CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>) y PL/CP (CD19<sup>int</sup>CD138<sup>+</sup>) en cada cepa de ratón mostrando la expresión de PDL1 e indicando la IFM. En C, D y E se muestra un experimento representativo de 2.

Por último, evaluamos si señales desencadenadas a través de ligando de Toll o de citoquinas operan *in vivo*, en la infección con *T. cruzi*, para disparar la expresión de PDL1. Basados en nuestros resultados obtenidos *in vitro*, nuestro interés fue evaluar la participación de TLR-4, TLR-9 e IFN $\gamma$  en la generación de PL/CP PDL1<sup>high</sup> *in vivo* en animales infectados con *T. cruzi*. Lamentablemente sólo pudimos hacer la evaluación en base a la disponibilidad de cepas de ratones que tenemos en nuestro bioterio. Evaluamos si la generación de PL/CP PDL1<sup>high</sup>, en la infección con *T. cruzi*, está mediada por ligandos de TLR2, TLR4 o TNF. Para ello, ratones deficientes en TLR2 (TLR2KO), TLR4 (TLR4KO) o en el receptor de TNF (TNFRKO) fueron infectados con *T. cruzi* y la expresión de PDL1 fue evaluada sobre LiB y PL/CP generadas durante la infección. Animales KO no infectados correspondientes fueron utilizados como controles.

Observamos que los LiB de ratones TLR2KO y TNFRKO no infectados presentaron una expresión de PDL1 similar, y que la infección con *T. cruzi* induce un incremento en la expresión de esta molécula (Fig. 17D). Llamativamente, los LiB de ratones TNFRKO infectados presentaron un mayor incremento de expresión de PDL1 que los LiB de las otras cepas de ratones (WT y TLR2KO) (Fig. 17D). Los PL/CP generadas durante la infección, independientemente de la cepa de ratón infectada, presentaron altos niveles de IFM de PDL1, y mucho mayor que la que presentaron sus correspondientes LiB (Fig. 17D). Nuevamente, como sucedió con los LiB, los PL/CP de los ratones TNFRKO presentaron la mayor expresión de PDL1 con respecto a los PL/CP de ratones WT y TLR2KO (Fig. 17D). Por último, LiB de ratones TLR4KO infectados también presentaron un aumento en la expresión de PDL1, y a su vez, los PL/CP generadas por la infección presentaron una mayor expresión de PDL1 que sus correspondientes LiB (Fig. 17E).

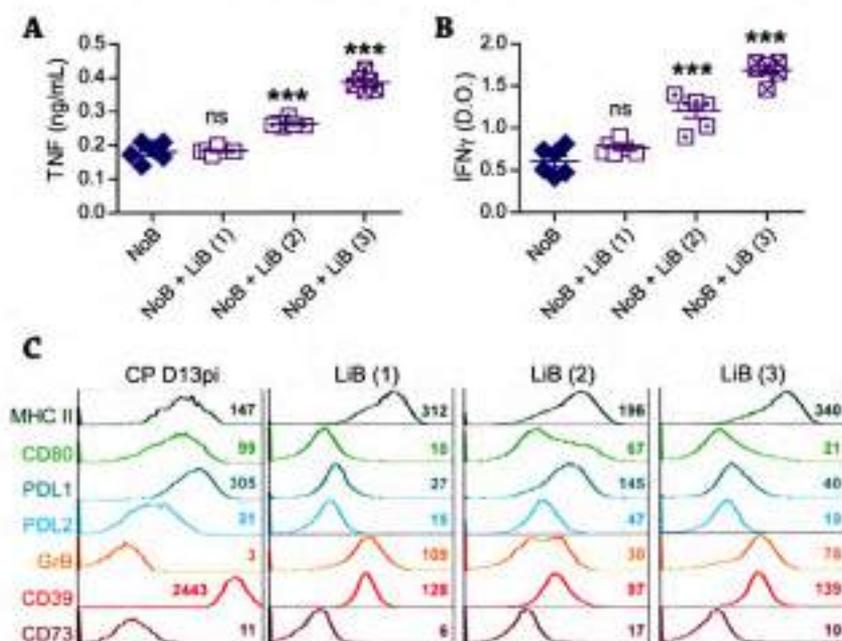
Los resultados indican que ligandos de TLR9 y 4, el *T. cruzi per se* e IFN $\gamma$  son capaces de aumentar la expresión de PDL1 en LiB *in vitro*, y que PL/CP generadas *in vitro* a través de estimulación por ligandos de Toll también presentan una mayor expresión de PDL1 que sus correspondientes LiB estimulados así como los PL/CP generadas por la infección con *T. cruzi*. Sin embargo debido a que la deficiencia de un único receptor de Toll no impidió la expresión de PDL1 ni en LiB ni en PL/CP de ratones infectados podemos concluir que *in vivo* podría operar más de un mecanismo, ya sea a través de IFN $\gamma$  individualmente o en conjunto con ligandos de Toll. Finalmente, TNF no estaría involucrado en la inducción de expresión de PDL1 *in vivo*, aunque podría cumplir una función inhibitoria ya que cuando la vía TNF/TNFR está ausente los LiB y los PL/CP expresan niveles de PDL1 significativamente superiores.

Dado que LiB estimulados y PL/CP generadas *in vitro* expresan altos niveles de PDL1, decidimos evaluar sus posibles funciones regulatorias. Realizamos un co-cultivo de la fracción NoB con LiB y PL/CP que se generaron a partir de los distintos estímulos. Para ello, LiB purificados de ratones WT no infectados fueron estimulados con AgTpY, AgTpY + LPS + IFN $\gamma$  y AgTpY + tripomastigotes de *T. cruzi* vivos. Estos estímulos tenían como finalidad hacer que el LiB entrara en contacto con AgTpY, y por otro lado, inducir PL/CP con altos niveles de PDL1. Luego de 48h de cultivo, estos LiB fueron lavados, contados y co-incubados con la fracción NoB de un animal infectado con *T. cruzi*, por 48h más, y la producción de IFN $\gamma$  y de TNF se midió en el sobrenadante de cultivo, por ELISA. El sobrenadante del co-cultivo de la fracción NoB junto con LiB cultivados con AgTpY presentó concentraciones de TNF e IFN $\gamma$  similares al sobrenadante de la fracción NoB sola (Fig. 18A, B). Sorpresivamente, el co-cultivo de la fracción NoB con LiB estimulados con AgTpY + LPS + IFN $\gamma$  generó un aumento en los niveles de TNF e IFN $\gamma$  en el sobrenadante de cultivo comparado con la fracción NoB sola (Fig. 18A, B). De manera similar a la anterior, el co-cultivo con LiB pre incubados con AgTpY + Tripomastigotes también generó un incremento significativo en la secreción de TNF e IFN $\gamma$  comparado con la fracción NoB sola (Fig. 18A, B). Los resultados indican que lejos de cumplir una función inhibitoria, los LiB generados en presencia de AgTpY + LPS + IFN $\gamma$ , o de AgTpY + tripomastigotes llevan adelante una función estimuladora o inductora de producción de TNF e IFN $\gamma$ .

Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que los estímulos utilizados inducen cambios en la expresión de diferentes moléculas de superficie, más allá de la expresión de PDL1, que influyen en el tipo de respuesta generada. Es por ello que por citometría de flujo determinamos el perfil de moléculas de superficie presentes en los LiB incubados con los diferentes estímulos, y comparamos este perfil con el de PL/CP provenientes de un ratón WT con 13 días de infección.

Los LiB incubados con AgTpY presentaron niveles incrementados de expresión de MHCII y disminuidos de CD80 en comparación a los PL/CP; además no mostraron la misma expresión de PDL1 y PDL2, ni tampoco de CD39 ni CD73 que se observa en PL/CP *in vivo* (Fig. 18C). Llamativamente, estas células presentaron niveles incrementados de intensidad de fluorescencia media de GrB (Fig. 18C). Por otra parte, LiB incubados con AgTpY + LPS + IFN $\gamma$  presentaron leves aumentos en la expresión de MHCII, PDL2, y CD73, y una leve disminución en CD80; sin embargo no aumentaron la expresión de PDL1 ni de CD39 de la misma forma que los hacen los PL/CP *in vivo*, y presentaron un aumento en la expresión de GrB (Fig. 18C). Por último, LiB incubados con

AgTpY + tripomastigotes presentaron un aumento en la expresión de MHCII y de GrB, disminuciones en la expresión de CD80, PDL1, PDL2, y CD39, y niveles similares de CD73, con respecto a PL/CP generadas *in vivo* en la infección con *T. cruzi* (Fig. 18C).



**Figura 18:** LiB estimulados *in vitro* indujeron la secreción de TNF y de IFN $\gamma$  por células NoB, y no presentaron el mismo perfil de moléculas de superficie que PL/CP generadas *in vivo* con la infección con *T. cruzi*. Ratones WT (n=4) fueron sacrificados y sus esplenocitos fueron obtenidos, para la posterior purificación de LiB con Acs específicos para CD43 unidos a perlas magnéticas. Se obtuvo la fracción de LiB (CD43<sup>+</sup>), y la misma se cultivó durante 48h en presencia de diferentes estímulos: (1) AgTpY, (2) AgTpY + LPS + IFN $\gamma$ , y (3) AgTpY + tripomastigotes *T. cruzi* vivos. Luego se lavaron, y contaron los LiB estimulados, y una fracción se tiñó para citometría de flujo con Acs específicos para CD19, B220, CD138, MHCII, CD80, PDL1, PDL2, GrB, CD39, CD73. Otra fracción se incubó con la fracción NoB de ratones infectados. Para obtener la fracción NoB, ratones WT (n=3) fueron infectados con *T. cruzi* cepa Y-br y sacrificados al día 13pi. Sus esplenocitos fueron obtenidos, y una fracción se tiñó para citometría de flujo con los mismos Acs mencionados previamente, y con la otra fracción se hizo un pool y se purificó la fracción NoB (CD43<sup>+</sup>) con Acs anti CD43 unidos a perlas magnéticas. Se realizó un co-cultivo 1:1 de células NoB y de LiB estimulados en presencia de AgTpY. Como control se cultivó la fracción NoB sola en presencia de AgTpY. Luego de 48h se determinaron las concentraciones de (A) TNF e (B) IFN $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo. \*\*\*p<0.01 Anova de una vía de muestras repetidas con post test de Dunnett, control: NoB. (C) Histogramas representativos de la expresión de MHCII, CD80, PDL1, PDL2, GrB, CD39, CD73 en la población de PL/CP (Gate realizado en CD19<sup>int</sup>CD138<sup>+</sup>) de animales infectados al día 13pi, y en los LiB (CD19<sup>int</sup>B220<sup>+</sup>) luego del cultivo inicial de 48h con los diferentes estímulos. El número indica la IFM.

En conjunto, los resultados de esta última sección indicarían que los PL/CP generados durante la infección con *T. cruzi* son capaces de regular *in vitro* a células secretantes de TNF e IFN $\gamma$ . Estos PL/CP se ubican en focos EF y aparecen más temprano que los LiB de CG. Los PL/CP expresan CD11c, PDL1 y otros receptores asociados a funciones regulatorias como PDL2 y CD39. La expresión de PDL1 se indujo en los LiB a través de estímulos como ligandos de Toll, el *T. cruzi* e IFN $\gamma$  *in vitro*. Los PL/CP generados tanto *in vitro* como *in vivo* presentaron la mayor expresión de PDL1, sin embargo el

aumento en la expresión de PDL1 en LiB o PL/CP no garantiza una función regulatoria ya que los experimentos *in vitro* mostraron que, al contrario de ejercer una regulación negativa sobre células productoras de TNF e IFN $\gamma$ , favorecieron la secreción de éstas citoquinas. En estas condiciones experimentales los LiB parecen tener más una función presentadora de Ag que una función regulatoria. Los resultados indican que los LiB y PL/CP de los ratones infectados que ejercen una función regulatoria tienen un fenotipo particular que no es expresado por sus equivalentes obtenidos *in vitro*, con menos niveles de MHCII y mayores niveles de PDL1 y CD39 que LiB estimulados *in vitro*.



**4**

**DISCUSIÓN**

### 4.1] La ausencia de LiB condiciona la respuesta inmune en la infección con *T. cruzi*

Con los resultados obtenidos en los experimentos de la presente tesis doctoral hemos identificado que los LiB, y en mayor medida, los PL/CP de ratones infectados con *T. cruzi* son capaces de condicionar negativamente la respuesta de células secretantes de TNF e IFN $\gamma$ , hecho que les permitiría controlar el proceso inflamatorio que se genera en la enfermedad de Chagas experimental.

Para llegar a estas conclusiones, y con el objetivo original de evaluar el rol de los LiB en la infección con *T. cruzi*, tomamos ventaja de ratones muMT. Los ratones muMT presentan una alteración en la expresión de la cadena pesada m de la IgM en la membrana, lo que lleva al arresto de la diferenciación del LiB en el estadio pre-B en médula ósea, y así, LiB maduros nunca salen a periferia [198]. Consecuentemente, estos ratones tampoco tienen Acs. Estos ratones brindan un modelo para evaluar tanto las funciones de los Acs, como las de los LiB y las de su producto de diferenciación celular, los PL/CP, que incluyen presentación antigénica y/o el condicionamiento de la respuesta celular a través de la secreción de citoquinas [199-202].

En el desarrollo de esta tesis doctoral, observamos que mientras los ratones WT (controles) infectados sobreviven a la infección con *T. cruzi*, los ratones muMT, en su mayoría, no lo hacen (Fig. 1A). Tal como fue previamente descrito [20], los resultados advierten un rol fundamental de los LiB durante la infección por este protozoario. Los ratones muMT presentaron una parasitemia más elevada al día 9pi, día del pico de la misma, que ratones WT infectados (Fig. 1B), la cual se correspondió con un aumento en el parasitismo tisular en bazo e hígado al mismo día pi y en bazo al día 15pi (Fig. 1C). Sin embargo la parasitemia logró ser controlada así como el parasitismo tisular. A pesar de que no se puede descartar completamente que la mayor carga parasitaria cause un daño irreversible en tejidos, provocando días más tarde la muerte de los ratones muMT infectados, nosotros inferimos que como los mismos no presentan diferencias significativas en carga parasitaria y parasitemia, respecto de los ratones WT, cerca del tiempo pi cuando comienzan a morir, la falta de control del parásito no sería la causa de muerte. Si bien nuestros datos son similares a los previamente reportados en cuanto a que los ratones deficientes en LiB infectados con *T. cruzi* tienen mayor parasitismo [20], los resultados acerca de la respuesta inmune son diferentes. Cardillo y col [20] muestran que la

exacerbación en la parasitemia, y la falta de control sobre la misma, en ratones muMT infectados con *T. cruzi* está relacionada con bajos niveles de citoquinas inflamatorias y números bajos de LiT CD4<sup>+</sup> de memoria central y efectores, y de Li T CD8<sup>+</sup> generados durante la fase aguda de la infección. Estas diferencias en los resultados obtenidos pueden ser explicadas por la diferencia en la cepa y dosis de parásitos utilizada en la infección experimental así como en la edad de los animales. Mientras que en esta tesis hemos utilizado una cepa poco virulenta (Y-br) y mayor edad en los animales, Cardillo y col utilizaron tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahuén y ratones con 1 o 2 meses de edad. En ese trabajo sugieren que los LiB cumplen una función protectora de la infección porque condicionan la respuesta de LiT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> efectores, posiblemente a través de su capacidad de presentar Ags. En consonancia, ha sido demostrado que los LiB son capaces de promover respuestas protectoras contra la infección por *Salmonella*, en donde los ratones deficientes en LiB son menos resistentes a la infección por este microorganismo [203], y que generan un menor porcentaje de LiT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productores de IFN $\gamma$ , que ratones WT [204]. Para que los LiB ejerzan el efecto protector es necesaria la señalización vía BCR, la expresión de MHCII, y la secreción de IFN $\gamma$  por parte de los LiB [205].

También se ha descrito que los LiB son responsables del control de la carga parasitaria en ratones infectados con *Toxoplasma gondii* [206]. Ratones muMT infectados con *T. gondii* son capaces de sobrevivir a la etapa aguda de la infección, pero luego mueren presentando grandes áreas de necrosis en cerebro, asociadas a quistes de taquizoitos. La transferencia pasiva de suero inmune para *T. gondii*, previene la formación de quistes en el cerebro de los ratones muMT infectados, y evita su temprana mortalidad [206]. En este caso, la protección de los LiB está mediada por su capacidad secretora de Acs más que por su capacidad presentadora de Ags o regulatoria.

En el presente trabajo de tesis doctoral observamos que los ratones muMT infectados presentan un incremento en diferentes citoquinas proinflamatorias (Fig. 2) y que ese incremento podría estar asociado a la mortalidad de los ratones. El incremento de respuesta proinflamatoria, en ausencia de LiB, también ha sido reportado en otras infecciones. En la infección con *Coxiella burnetti* [207] la deficiencia en LiB no favorece el desarrollo de la enfermedad clínica o altera la eliminación de bacterias pero aumenta la severidad del daño histopatológico. En un modelo de infección con *Leishmania donovani* se observó que ratones muMT eliminan los parásitos en hígado más rápidamente que ratones WT y no establecen la infección en el bazo; pero la rápida eliminación de parásitos en los ratones muMT se asocia con una aparición más rápida de granulomas hepáticos más extensos, que los de ratones de tipo salvaje. El hígado de los ratones muMT infectados muestra signos de patología destructiva asociados con el aumento del número de

neutrófilos infiltrantes [208]. Los datos indican que, en ciertas infecciones, los LiB cumplen una función regulatoria de tipo inhibitoria, ya que en su ausencia el hospedador infectado genera una respuesta inflamatoria con daño tisular.

Uno de los principales mecanismos a través de los cuales los LiB ejercen su función reguladora es a través de IL-10 (más adelante discutimos mecanismos de regulación). En un modelo de infección viral con Citomegalovirus murino (CMVM) se reportó, durante la infección crónica, la presencia de LiB con fenotipo regulatorio CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>hi</sup> [209] infiltrando cerebro. En concordancia, ratones Jh(-/-) deficientes en LiB desarrollaron una respuesta neuroinmune exacerbada evidenciada por la acumulación de LiT CD8<sup>+</sup> dentro del cerebro, así como de activación de la microglía (mayor expresión de MHCII) y menores niveles de células Treg Foxp3<sup>+</sup>. Ensayos *in vitro* permitieron demostrar el rol regulador de los LiB, ya que LiB estimulados para producir IL10 fueron capaces de disminuir la secreción de TNF por células de la microglía incubadas con el CMVM y de aumentar la proliferación de células Tregs [209].

En algunos casos, la función regulatoria o supresora de los LiB puede llegar a ser deletérea para el hospedador infectado; por ejemplo, al suprimir la respuesta protectora necesaria para erradicar al agente infectante. Tal es el caso del modelo de infección con la bacteria intracelular *Brucella abortus*, en donde ratones deficientes en LiB (muMT y Jh(-/-)) son capaces de controlar de una mejor manera la infección, presentando menor recuento de unidades formadoras de colonias, debido a un incremento en el porcentaje de LiT productores de IFN $\gamma$  y a un menor porcentaje de células productoras de IL10 y TGF $\beta$  [210]. De manera similar, en un modelo de infección por *Listeria* se evidenció la expansión de la población B10, la cual es capaz de suprimir la respuesta de macrófagos, y así favorecer el establecimiento y replicación de la bacteria [211]. En un trabajo en pacientes infectados con hepatitis B, se evidenció que los pacientes presentaban recaídas de la enfermedad cuando presentaban un aumento en la secreción de IL10, y presencia de LiB productores de IL10. Ensayos de depleción *in vitro* determinaron que la población de LiB productora de IL10 suprime la producción de IFN $\gamma$  por LiT CD8<sup>+</sup>, y que la IL10 es capaz de modular la polifuncionalidad de las mismas [212].

#### **4.2] TNF como mediador de la mortalidad y morbilidad en la infección con *T. cruzi***

Debido a que los ratones muMT tienen una exacerbada respuesta inflamatoria, nuestra hipótesis es que los LiB actúan de una manera protectora ejerciendo una función regulatoria de la inflamación. Observamos en plasma de los ratones muMT infectados un

aumento en la concentración de IFN $\gamma$  en el día 9pi, y un aumento sostenido de TGF $\beta$  y de TNF, en comparación a ratones WT infectados (Fig. 2). En particular identificamos, en los ratones muMT, síntomas y signos asociados a morbilidad mediada por TNF, tales como disminución del peso corporal, disminución de glucosa en plasma, aumento de transaminasas hepáticas, apoptosis de hepatocitos, áreas de necrosis y vasodilatación en hígado (Fig. 3), los cuales se correlacionan con altos niveles de TNF [18, 181, 213, 214].

Decidimos luego evaluar al TNF como mediador de la mortalidad y morbilidad de los ratones muMT infectados debido a: (a) que el TNF se encuentra aumentado de manera sostenida en los días pi cercanos a la muerte de los ratones muMT, (b) que los mismos presentan síntomas asociados a elevados niveles sistémicos de TNF [18, 181, 213], (c) que esta citoquina ha sido descrita junto con IFN $\gamma$  como una de las involucradas en la patogénesis de la enfermedad de Chagas [15, 16, 73, 180], y (d) que presenta una concentración diferencial entre los ratones muMT que sobreviven a la infección y los que no. Para llevar a cabo esta evaluación, los ratones muMT fueron tratados con un Ac específico para TNF con el objetivo de bloquear o inhibir su actividad biológica.

En la bibliografía está documentado que la inhibición de la actividad de TNF ha sido ensayada utilizando diferentes protocolos y drogas, tanto para evaluar el accionar de esta citoquina en la etapa crónica como en la aguda de la infección con *T. cruzi*. Así por ejemplo, se evaluó el efecto de Etanercept, un receptor soluble de TNF asociado a una Ig, en ratones infectados que cursaban la fase crónica de la infección (con 11 meses de infección). Observaron que el tratamiento empeora la actividad cardíaca de los ratones, no afecta su sobrevivencia, ni la carga parasitaria, ni los niveles de expresión de citoquinas [179]. En otros dos trabajos, utilizaron Infliximab, el cual es un Ac monoclonal que inhibe la acción del TNF. En el primero de los trabajos, la administración de Infliximab realizada a partir de los 4 meses pi, produce una disminución en la concentración de TNF y de IFN $\gamma$  y en el porcentaje de células Ly6C $^+$  y F4/80 $^+$ TNF $^+$  y lleva a un aumento en el porcentaje de células productoras de IL10 y doble productoras de IL10 y TNF. También reduce el porcentaje de LiT CD4 $^+$  secretores de IL17, aumenta la proporción de LiT CD4 $^+$  secretores de IL10 y disminuye la actividad citotóxica *in vivo* [180]. En el segundo reporte, para el cual utilizaron un modelo de infección en ratas, demostraron que la administración de Infliximab durante el estadio crónico de la infección disminuye las lesiones cardíacas en corazón, y esto se correlaciona con una menor expresión de TNF, una mayor expresión de IL10, y un menor infiltrado de LiT en corazón [215]. La utilización de Infliximab, pero en la etapa aguda de la infección, demostró que TNF es responsable de la apoptosis de hepatocitos [214]. Por último, el uso de ratones TNFR1KO o el tratamiento con Infliximab en ratones con 14 días de infección lleva a una disminución de CK-MB (una enzima

indicadora de daño cardíaco), y esto se correlaciona con un menor infiltrado de LiT en corazón, y con un menor porcentaje de LiT CD8<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> en circulación [216].

En el presente trabajo de tesis utilizamos un Ac de rata específico contra TNF, con el objetivo de evaluar si el incremento sostenido de TNF a nivel sistémico en los ratones muMT infectados era la causa de mortalidad. Observamos que el tratamiento con anti-TNF mejora inicialmente el peso corporal de los ratones muMT infectados (Fig. 4), lo cual se corresponde con que esta citoquina ha sido descripta como responsable de caquexia [217]. Sin embargo, a pesar de esta notable mejoría en el inicio de la administración, el tratamiento con anti-TNF no fue capaz de mejorar la sobrevida de los ratones muMT infectados y se observa una recidiva en la caquexia (Fig. 4). Notablemente, determinamos que los ratones tratados no presentaban diferencias en la carga parasitaria en tejido (Fig. 4), entonces más allá del rol protector de esta citoquina durante la infección con *T. cruzi* [11, 182], una reactivación de la infección no sería la causa de muerte de los ratones muMT infectados tratados. En estos animales, la concentración de citoquinas proinflamatorias tales como IL12, IFN $\gamma$ , y el mismo TNF está incrementada; como así también la actividad de transaminasas hepáticas. Es probable que el tratamiento con el Ac neutralizante para TNF inhiba además una posible función auto-regulatoria de esta citoquina, potenciando la vía proinflamatoria de tipo 1. Un fenómeno similar fue reportado en dos trabajos realizados en animales infectados con *T. cruzi*. En uno, observaron que el tratamiento de ratones IL10KO infectados con *T. cruzi* con anti-TNF logra una leve mejoría en los síntomas y la sobrevida de los animales pero no reproduce el fenotipo clínico de los ratones WT infectados, ya que el tratamiento induce una mayor secreción de TNF, que se correlaciona con una recaída en los síntomas y la muerte de los ratones tratados [18]. A diferencia de nuestras observaciones, los niveles de IL12 y de IFN $\gamma$  en los ratones IL10KO infectados tratados o no son similares. En un segundo trabajo se demostró que el tratamiento con dos Acs diferentes contra TNF tienen resultados opuestos; mientras un Ac logra reducir la concentración de TNF y mejorar la caquexia de los ratones, el otro Ac induce mayor secreción de TNF endógeno (TNF libre de Ac neutralizante) y empeora la caquexia y la mortalidad de los ratones infectados con *T. cruzi* [218].

Debido a que todos estos datos son en algún punto opuestos entre sí, realizamos una búsqueda bibliográfica de trabajos que utilizaron el mismo Ac que el usado en la presente tesis. Varios de estos trabajos no reportaron el comportamiento en los niveles de TNF sistémicos [219-225] y dos trabajos mostraron resultados opuestos a los obtenidos por nosotros. Observaron que el tratamiento con anti TNF lleva a una disminución en la concentración de TNF sin modificaciones en la concentración de IFN $\gamma$  [226] y a una recuperación del peso corporal aparentemente definitiva [227]. Otros dos trabajos muestran

que el TNF tiene acción sobre células con funciones regulatorias, ya sea favoreciendo su proliferación [219] o contrariamente, induciendo su apoptosis [222]; por lo cual en el contexto de la infección por *T. cruzi*, en donde hay diversas células con funciones regulatorias, es posible que el bloqueo del TNF conlleve a una exacerbación de la respuesta de tipo 1 de manera indirecta, afectando a estas poblaciones supresoras. Por último, un trabajo sumamente interesante realizado en un modelo de infección por *Influenza* demostró que el TNF puede tener funciones regulatorias negativas y puede prevenir la patología observada en pulmón durante la infección [228]. Los autores demostraron que el TNF soluble es capaz de limitar una respuesta de Lin<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> específicos, los cuales son causantes de la patología observada en pulmón. Las acciones del TNF son llevadas a cabo vía el receptor TNFR1, suprimiendo la secreción de citoquinas y quemoquinas, tales como IL6, CCL2, CXCL10, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , G-CSF, y en particular la IL15, la cual promueve la expansión de la población CD8<sup>+</sup>. Por otra parte, el TNF también es capaz de actuar directamente sobre los Lin<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> vía TNFR1 durante la etapa de priming de estas células, haciéndolas sensibles a la muerte por apoptosis inducida por activación. Sorprendentemente, la eliminación del virus fue independiente del TNF, así como también la disminución del peso corporal de los ratones; y tanto los ratones TNFR1 como TNFR2KO infectados presentan un aumento en los niveles de TNF, sugiriendo un mecanismo auto-regulatorio [228].

Es probable que en nuestro modelo experimental, el tratamiento neutralizante con anti-TNF esté bloqueando las vías auto-regulatorias de la citoquina por un lado, y a su vez, bloqueando otras vías regulatorias, tales como la promoción de funciones inhibitorias de otras poblaciones, o la acción supresora directa sobre poblaciones proinflamatorias. Por otra parte, a pesar de que el tratamiento se inicia luego de presentarse el pico de parasitemia y cuando sus niveles comienzan a disminuir en ratones WT infectados, es posible que todavía haya poblaciones activándose o diferenciándose a células efectoras, en donde la regulación vía TNF todavía es importante. Esto explicaría parcialmente la diferencia de desenlaces en los tratamientos reportados y nuestro tratamiento; si se administra el anti-TNF en etapas crónicas, la acción del bloqueo resulta beneficiosa [180, 215], y si se administra en etapas agudas (como nosotros lo hicimos), resulta en una exacerbación de la respuesta y peor resultado [18, 218].

No se puede descartar sin embargo que los resultados, inesperados, se deban a las características del Ac utilizado, y podría ser revelador realizar otros tratamientos administrando diferentes Acs para determinar si el efecto depende del mismo, o si las características de la respuesta se deben particularmente a nuestro modelo experimental. También es relevante considerar si el Ac podría estar influenciando el tiempo de vida

media de la citoquina en circulación, aumentándola y así amplificar sus efectos, puede también que esté generando inmunocomplejos con mayor actividad que la citoquina sola, tal como se ha descrito en tratamientos con Acs específicos contra IL2, IL4 e IL7 [229]. Esto se podría esclarecer realizando ensayos de bioactividad midiendo el efecto del TNF solo y en presencia del Ac, utilizando células sensibles a TNF [218]. También se podría determinar midiendo la producción de TNF utilizando diferentes sistemas de ELISA en paralelo. En uno, utilizar un antisuero policlonal específico para TNF como Ac de captura (que permite medir el TNF total: libre y unido al Ac del tratamiento) y en otro el mismo Ac del tratamiento in vivo como Ac de captura (determinando así sólo el TNF libre, ya que el TNF unido al Ac del tratamiento no tendría los sitios de reconocimiento disponibles para el Ac de captura) [218].

A pesar de que con el tratamiento con anti-TNF no logramos revertir la respuesta inflamatoria, podemos concluir que hay una correlación evidente entre los síntomas de los ratones muMT infectados y los reportes que asocian esos síntomas con la sobreproducción de TNF. Y también que el TNF se encuentra aumentado en los días en los que los animales mueren mientras que los valores son bajos cuando el animal muMT infectado sobrevive, sugiriendo que esta citoquina participa en la morbi-mortalidad de los ratones deficientes en LiB.

### 4.3] LiT CD4+ patogénicos en la enfermedad de Chagas

Cuando evaluamos las poblaciones de células productoras de TNF en los distintos órganos de los ratones infectados con *T. cruzi*, como era de esperar, debido a la concentración elevada de TNF en plasma, los ratones muMT infectados presentan un mayor porcentaje de células productoras de TNF que los ratones WT (Fig. 5). Además determinamos que la población productora de TNF, está compuesta mayoritariamente por LiT CD4<sup>+</sup>, seguidos de LiT CD8<sup>+</sup> en ambos grupos experimentales (Fig. 6). Sin embargo, los LiT de los ratones muMT presentan un fenotipo más proinflamatorio que los LiT productores de TNF de los ratones WT infectados, ya que tienen mayor expresión de Ly6C [185, 186] (Fig. 6). El perfil de los LiT CD4<sup>+</sup> de los ratones muMT corresponde a un perfil Th1, con un gran porcentaje de células secretantes de IFN $\gamma$  y TNF, y disminuidos porcentajes de células secretantes de IL10 e IL17, así como de células que expresan Foxp3 (Fig. 7).

La promoción, inducción o exacerbación de poblaciones o funciones ejercidas por los LiT, en ausencia de LiB, ya ha sido descrito en diferentes modelos de infección, autoinmunidad y cáncer [29, 149, 150, 167, 172, 210, 212, 230]. En esta tesis doctoral demostramos que los LiB en la infección con *T. cruzi* ejercen una función regulatoria sobre

los LiT CD4<sup>+</sup>, ya que en su ausencia, se exagera un perfil Th1. Queda pendiente determinar si estos LiT CD4<sup>+</sup>, que en ausencia de LiB están desregulados, son la causa de la incrementada inflamación sistémica que sufren los ratones muMT infectados con *T. cruzi*. El perfil de los LiT CD4<sup>+</sup> ha sido asociado a la patología chagásica cardíaca en estadios crónicos [15, 74, 75]. En nuestro modelo de infección, en donde los ratones muMT mueren durante la etapa aguda o aguda-tardía, se podría evaluar la contribución de los LiT CD4<sup>+</sup> a la mortalidad con experimentos de depleción. De ser responsables, la depleción de los LiT CD4<sup>+</sup> en los ratones muMT infectados debería permitir la recuperación, al menos parcial, de la sobrevida y morbilidad de los animales. Es importante señalar que la depleción debería ser previamente probada en ratones WT infectados, sobre todo el día a partir del cual se comenzaría con el tratamiento, ya que los LiT CD4<sup>+</sup> son protectores durante la infección con *T. cruzi* [8].

En otros modelos experimentales se pudo evidenciar, mediante transferencia, que los LiT CD4<sup>+</sup> "patogénicos" pueden ser deletéreos para el animal receptor. En un modelo de diabetes autoinmune, la transferencia de LiT CD4<sup>+</sup> específicos para un Ag expresado en el páncreas induce que LiT CD8<sup>+</sup> (responsable de sostener la progresión de la enfermedad a través de la destrucción de las islas pancreáticas) adquieran un perfil proinflamatorio [231]. Mediante la inyección de LiT CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub> provenientes de un ratón denominado "sanroque", el cual desarrolla espontáneamente CG causantes de síntomas relacionados a Lupus, se puede transferir la capacidad de desarrollar CG, en ausencia de estímulos, en un ratón WT [232]. En un modelo de artritis, el bloqueo de la acción de TNF utilizando un Ac anti-TNF expande una población de Li Th1/Th17 que cuando es transferida provoca el desarrollo de la enfermedad en ratones SCID inyectados con colágeno [233]. Por último, la transferencia adoptiva de LiT CD4<sup>+</sup> obtenidos de ratones infectados con *T. cruzi* a ratones sin infección, desencadena un infiltrado celular en corazón y patología cardíaca [234]. Todos estos estudios sobre la evaluación de perfiles inflamatorios en el progreso de patologías infecciosas o autoinmunes indican la importancia de una correcta regulación de los LiT, y cómo éstos pueden ocasionar enfermedad. Nosotros evaluamos si la transferencia de LiT CD4<sup>+</sup>, generados en ausencia de LiB durante la infección con *T. cruzi*, podía reproducir la morbilidad y mortalidad en ratones WT infectados. No encontramos grandes alteraciones en los ratones WT infectados que recibieron los LiT CD4<sup>+</sup> de los ratones muMT infectados en cuanto a mortalidad ni morbilidad, sin embargo, observamos que los LiT CD4<sup>+</sup> del ratón WT receptor adquirieron el mismo fenotipo (Ly6C<sup>+</sup>) que mostraban los LiT CD4<sup>+</sup> del ratón muMT infectado, así como un incremento en los niveles de IFN $\gamma$  sistémicos (Fig. 8). Los resultados indican que los LiT CD4<sup>+</sup> de los ratones muMT infectados influyen sobre otras poblaciones de LiT, tornándolas pro-inflamatorias. Es

probable que para poder visualizar un efecto sistémico se deba transferir un mayor número de células, o medir otro índice de morbilidad, comparando por ejemplo alteraciones cardíacas o hepáticas a tiempos más tardíos. Nosotros evidenciamos que los LiT generados en ausencia de LiB, son predominantemente inflamatorios Th1, y que son capaces de alterar parcialmente el perfil de otros LiT.

#### 4.4] PL/CP PDL1+ regulatorias en la infección con *T. cruzi*

En el presente trabajo de tesis pudimos determinar que la ausencia de PL/CP en cultivos celulares de esplenocitos infectados con *T. cruzi* exagera la producción de TNF e IFN $\gamma$ , por lo que podemos concluir que los PL/CP generadas en la infección por *T. cruzi* ejercen una función regulatoria y lo harían a través de la expresión de PDL1.

Estudios cinéticos de las poblaciones de LiB evidenciaron que, en el momento en que se regulan los niveles de TNF en los ratones WT infectados (Fig. 2-3), aparecen PL/CP de localización EF, que expresan altos niveles de PDL1 (Fig. 9, 11, 16). Por otra parte, y de acuerdo con el rol de PDL1 en la regulación de la respuesta inmune [134], ratones muMT carentes de LiB y por consiguiente de PL/CP presentan una exacerbada respuesta proinflamatoria y elevados niveles de TNF sistémicos. En concordancia, ensayos de depleción *in vitro*, demostraron que en ausencia de PL/CP (no así de LiB) los esplenocitos de ratones infectados con *T. cruzi* producen una mayor concentración de TNF y también de IFN $\gamma$  (Fig. 15). En conjunto, los datos obtenidos en esta tesis apoyan la conclusión de que los PL/CP generadas en el período agudo de la infección cumplen una función regulatoria.

La función regulatoria de las células secretantes de Acs, ya sean plasmoblastos o CP, ha sido recientemente reportada. Los trabajos de Matsumoto y colaboradores [30] demostraron que durante la EAE las principales células productoras de IL10 son plasmoblastos CD138<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> presentes en ganglios drenantes. A estas células se las diferencia de CP en base a la expresión de Blimp1, mientras que CP presentan una alta expresión Blimp1 los plasmoblastos tienen una expresión intermedia. Utilizando ratones Prdm1<sup>fl</sup>Mb1<sup>Cre/+</sup>, cuyos LiB son incapaces de expresar Blimp1 y por ello también incapaces de diferenciarse a plasmoblastos y CP, demostraron que la limitación de los síntomas de EAE está mediada por plasmoblastos productores de IL10. Cabe resaltar que los plasmoblastos con capacidad regulatoria se localizan en focos extrafoliculares y no provienen de CG, ya que ratones Bcl6<sup>fl/fl</sup> (incapaces de desarrollar CG) no presentan síntomas exacerbados de EAE, y los plasmoblastos se originan de igual modo. Los plasmoblastos CD138<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> presentan además una mayor expresión de MHCII y CXCR4, y menor expresión de CXCR5 que sus correspondientes LiB [30]. En un modelo de infección con *Salmonella*, también se reportó que las CP pueden actuar como células

regulatorias a través de la secreción de IL10 [29] y de IL35 [28]. Por un lado, Neves y colaboradores [29] evidenciaron que ratones cuyos LiB eran deficientes en MyD88 son más resistentes a la infección por *Salmonella*. En particular, los ratones MyD88KO infectados presentan un menor porcentaje de CP secretoras de IL10, responsables de suprimir la respuesta de células NK, neutrófilos y LiT (que componen la respuesta inmune protectora contra la bacteria [29]). Por otra parte, Shen y colaboradores [28] demuestran que CP secretoras de IL35 tienen funciones supresoras en EAE y en la infección por *Salmonella*. En este caso la producción de IL10 y de IL35 está dada por CP muy diferenciadas (CD138<sup>+</sup>CD22<sup>+</sup>) [28].

En nuestro caso, los resultados obtenidos indican que las PL/CP regulan la secreción de TNF *in vitro* e *in vivo* ya que la ausencia de LiB y PL/CP genera una desregulación de TNF. El modelo experimental con ratones muMT permite hacer correlaciones en cuanto a la deficiencia permanente de LiB, los resultados obtenidos *in vivo* brindan información general sobre la influencia de los LiB sobre el control de la infección y el resto de las poblaciones celulares, no así, acerca de su influencia en determinadas etapas de infección, ni tampoco si una subpoblación particular de LiB (LiB inmaduros, de zona marginal, peritoneales o de CG) tiene implicancias patogénicas, protectoras, o regulatorias. Para determinar fehacientemente que los PL/CP son las que tienen funciones regulatorias y no los LiB, un modelo de ratón que debería ser utilizado es el *Blimp1<sup>fl</sup>/CD19<sup>cre/+</sup>* [235]. Este ratón contiene una recombinasa llamada Cre, bajo el promotor de CD19, es decir, que todas las células CD19<sup>+</sup> (LiB) van a expresar la recombinasa. Cre actúa reconociendo sitios Flox del ADN, eliminando el gen que se encuentre flanqueado por ellos. En este caso, el ratón contiene el gen que codifica para *Blimp1* flanqueado por sitios Flox; con lo cual, los LiB de estos ratones no expresan *Blimp1*. Como *Blimp1* es necesario para la diferenciación de los LiB a PL/CP, este ratón es incapaz de generar PL/CP. Dados nuestros resultados, este modelo permitiría verificar la función regulatoria de las CP *in vivo*, validando nuestros resultados.

Por otra parte, para demostrar que los LiB no ejercen las funciones regulatorias sino que las mismas son ejercidas por CP, se podría utilizar un modelo experimental realizando una depleción *in vivo* exclusivamente de LiB. En este caso, la depleción se podría hacer luego de la generación de las CP y así, en el animal infectado, permanecen las CP y no los LiB; evaluando así si las CP, solamente, son las necesarias para regular la respuesta inflamatoria en la infección por *T. cruzi* o si hacen falta ambos tipos celulares. Para realizar este tipo de ensayos se debe utilizar un Ac anti-LiB, el cual reconoce LiB y promueve la eliminación de la población por lisis o citotoxicidad mediada por Acs. Por ejemplo, se puede utilizar un Ac anti-CD20, el cual se utiliza normalmente para eliminar LiB. Es

importante destacar que con este tipo de tratamiento no se eliminan todas las CP [236, 237], por lo cual sería necesario en una primera instancia, determinar la cinética de desaparición de los LiB, y si se depletan (y en qué medida) o no las poblaciones de PL/CP en animales tratados. De todas maneras, resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que con una sola inyección de Ac anti-CD20 se logra una depleción completa de LiB a partir del día 10 post inyección; por lo cual, metodológicamente sería dificultoso aplicar este tratamiento en nuestro modelo, ya que el período en que se produce la regulación por PL/CP (entre los días 12-15) es muy corto, y el tiempo necesario para la depleción es muy largo. De comenzarlo a tiempos tempranos, se corre el riesgo de eliminar LiB que vayan a generar PL/CP regulatorios, y de hacerlo más tardíamente, el fenómeno regulatorio ya puede haber ocurrido. En conclusión este tratamiento con anti-CD20 no sería el más indicado, en nuestro modelo experimental, para esclarecer los mecanismos inmunológicos de interés.

Otro modelo experimental en donde se puede realizar la depleción de LiB es utilizando ratones CD19<sup>Cre</sup>-iDTR [238]. Estos animales son capaces de expresar el receptor para la toxina diftérica en células CD19<sup>+</sup>. Esto permite que, con la inyección diaria de la toxina, se puedan eliminar los LiB casi en su totalidad [238]. Todas las poblaciones de LiB se eliminan con la misma eficiencia, pero no así las CP. Sería importante establecer si este modelo puede ser útil para responder a nuestro interrogante, al conocer los cambios que sufre la población de PL/CP luego de este tipo de depleción.

Cabe resaltar que en ambos métodos de depleción, los ratones infectados también tendrían anticuerpos circulantes, tanto naturales como inducidos de manera policlonal por el parásito, y, de haberse generado, Acs específicos para el *T. cruzi* (aunque la generación de éstos requiere más tiempo, por lo cual es probable que a los días 11-15pi no se encuentren). Por lo cual, los resultados arrojados por estos modelos, serían independientes de la capacidad secretora de Acs de los LiB, y dependientes de otras funciones del LiB tales como la secreción de citoquinas, quemoquinas, o a través de proteínas de superficie que requieren contacto celular.

Por último, se podrían hacer experimentos de transferencia celular a los ratones muMT. Para ello se deberían purificar los PL/CP de los esplenocitos de ratones WT infectados e inyectarlas en ratones muMT infectados. De esta manera, sólo se podría evaluar el rol de los PL/CP y no así de los LiB. En nuestro laboratorio, las experiencias de transferencias adoptivas a ratones muMT no han resultado totalmente satisfactorias, ya que un muy bajo porcentaje de ratones recibe de manera correcta las células inyectadas; esto requiere que la cantidad de ratones muMT a ser inyectados sea grande, sobrepasando las capacidades de costo de los experimentos y de cría de ratones. Además, la sobrevida de

PL/CP purificadas por cell sorting es baja, por lo cual, purificar CP e inyectarlas en ratones muMT resulta muy complicado a nivel experimental y no ha podido ser llevado a cabo con éxito.

#### 4.5] Expresión de PDL1 y capacidad regulatoria

Tratando de identificar las moléculas que pueden participar de la regulación de la respuesta inmune en la infección con *T. cruzi* observamos, mediante el bloqueo *in vitro* con Acs específico para PD1 y PDL1, que la vía PD1/PDL1 participa en la regulación de células secretantes de TNF; no así el bloqueo de PDL2, indicando que PDL2 no tendría capacidad regulatoria sobre IFN $\gamma$  y TNF. Como las CP son las células que tienen la mayor expresión de PDL1, y el bloqueo *in vitro* con los Acs tiene el mismo resultado que la depleción celular, es probable que las CP ejerzan su función regulatoria por medio de este ligando (Fig. 15).

Hay pocos reportes describiendo funciones regulatorias ejercidas por LiB y CP a través de PDL1. Recientemente, casi simultáneamente con el desarrollo de esta tesis, se reportó que LiB PDL1<sup>hi</sup> mejoran los síntomas de EAE [167] y que en un modelo de protección de EAE a través de la administración de estrógeno, los LiB PDL1<sup>+</sup> juegan un papel fundamental en el control de la inflamación [168]. Por otro lado, en un modelo de tumor, se observó que plasmocitos IgA<sup>+</sup>PDL1<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup> son capaces de suprimir las respuestas citotóxicas de LiT CD8<sup>+</sup> [172]. En la infección con *T. cruzi*, la vía PD1/PDL1 ha sido poco estudiada. Se ha observado que las cepas más virulentas de *T. cruzi* inducen una mayor expresión de citoquinas anti inflamatorias y de PDL1, sugiriendo que el parásito utiliza esta vía como mecanismo de evasión [239]. Además, la infección en ratones PD1KO o WT tratados con anti-PD1 o anti-PDL1 induce una menor parasitemia y carga parasitaria, pero mayor respuesta inflamatoria en corazón, mayor secreción de IFN $\gamma$  y TNF, y mayor mortalidad [133]. En conjunto, estos trabajos sugieren que en la enfermedad de Chagas experimental, la vía PD1/PDL1 es una vía regulatoria que suprime respuestas protectoras y puede ser utilizada por el parásito como mecanismo de evasión, pero a su vez regula respuestas inflamatorias exacerbadas que perjudican al hospedador.

Nuevamente, para demostrar claramente que las CP ejercen su función regulatoria a través de PDL1, se deberían generar ratones quiméricos. Se podría realizar una quimera, en la cual se utilicen células de médula ósea de ratones PDL1KO y Blimp1<sup>flox</sup>CD19<sup>cre</sup>. En este caso, el ratón resultante tendrá leucocitos PDL1KO y leucocitos WT sin CP, será un ratón en el que no se pueden generar CP PDL1<sup>+</sup>. La única fuente de CP de estos ratones será PDL1KO, y permitirá evidenciar si PDL1 presente en las CP es el mediador de la actividad supresora de las CP. También se podría hacer un ratón quimera con mezclas de

células de médula ósea provenientes de ratones muMT y de ratones PDL1KO. En este caso, el ratón quimera resultante tendrá LiB y CP deficientes en PDL1 (similar a los ratones muMT con transferencia de LiB WT / PDL1KO, sólo que experimentalmente el ratón irradiado es mejor receptor de las células inyectadas). De comprobarse que el mecanismo regulatorio ejercido por las CP involucra la vía PDI/PDL1, sería un aporte sumamente novedoso tanto para el conocimiento general de la biología de los LiB y CP, como para la enfermedad de Chagas.

#### **4.6] Amplificación *in vitro* de células de la progenie B PDL1+ y capacidad regulatoria**

Así como se pueden manipular *in vitro* CDs para generar células con un perfil tolerogénico (regulatorio) y se pueden generar Li Tregs, para ser aplicados *in vivo*, en el tratamiento de enfermedades autoinmunes [240, 241], de manera análoga se podrían manipular a los LiB de modo de obtener células con capacidad regulatoria. Tal es así que LiB IL10<sup>+</sup> obtenidos *in vitro* fueron capaces de regular respuestas inflamatorias en un modelo de infección por CMVM en ratón [209].

En este contexto y con la idea de identificar señales que nos permitieran generar, y por qué no amplificar, la población de LiB y CP PDL1<sup>+</sup> para ser utilizadas como reguladores de inflamación, realizamos una serie de cultivos celulares con diferentes estímulos. Observamos que IFN $\gamma$  y ligandos de Toll como LPS (ligando de TLR4) y CpG-ODN (ligando de TLR9) son capaces de aumentar la expresión de PDL1 sobre los LiB y generar PL/CP con aún mayor expresión de este ligando (Fig. 17). Estas señales fueron demostradas inductoras de la expresión de PDL1 en cultivos con CP provenientes de pacientes con mieloma múltiple [242]. Estos estímulos a tiempos cortos de incubación no generan CP y a tiempos mayores si bien son capaces de generar CP, lo hacen a un bajo porcentaje. Cuando las células generadas fueron utilizadas en ensayos de co-cultivo para evaluar su capacidad supresora, sorpresivamente observamos que los protocolos utilizados no sólo no indujeron LiB con capacidad regulatoria, sino que los LiB inducidos *in vitro* promovieron la secreción de IFN $\gamma$  y TNF. Los datos indican que las poblaciones de LiB generadas *in vitro* poseen más capacidad de presentación antigénica que capacidad regulatoria. Los LiB inducidos presentaron altos niveles de expresión de PDL1, dejando ver que la mera expresión de este ligando no implica la capacidad para cumplir una función regulatoria. Los resultados nos indican que es importante considerar el perfil integral de receptores de superficie expresados en la célula, así como también la capacidad de secreción de citoquinas que adquiere con el estímulo. Aparentemente, las señales

impartidas a los LiB *in vitro* no reproducen de manera completa las señales que reciben los LiB *in vivo* para generar las CP con capacidad regulatoria.

Las CP generadas en la infección con *T. cruzi* tienen una menor expresión de MHCII que los LiB de los mismos animales o que los LiB estimulados *in vitro*, lo que implicaría que las CP poseen una menor capacidad de presentación antigénica que los LiB. La mayor expresión de moléculas MHCII sobre los LiB estimulados *in vitro* podría explicar el porqué de su capacidad de estimular la respuesta de LiT, más que de suprimirla. Además, sorpresivamente las CP generadas en la infección mostraron una alta expresión de CD39, la cual es una ectonucleasa capaz de catabolizar ATP en adenosina, y esta última tiene propiedades supresoras [163-165]. Ya se ha descrito que los LiB puede ejercer función regulatoria a través de la expresión de CD39 [166]; en este reporte, los LiB CD39<sup>+</sup> suprimen la proliferación de LiT autólogos [166]. Esto sugiere que además de la función supresora potencialmente mediada por la expresión de PDL1, las CP generadas *in vivo* podrían utilizar otros mecanismos de regulación.

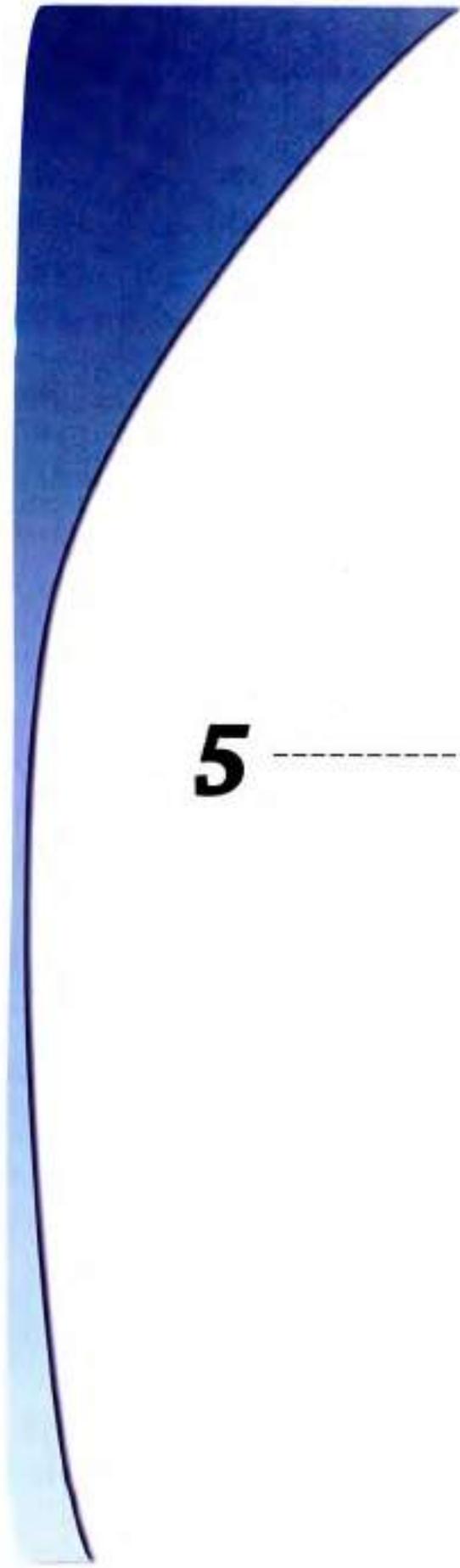
No solo hay diferencias en el perfil de expresión de moléculas de superficie entre los PL/CP generados *in vivo* con los LiB estimulados *in vitro*, sino también entre los PL/CP y los LiB activados *in vivo*. La determinación de la expresión de CXCR4 y CXCR5 brindan información acerca del grado de diferenciación de los PL/CP y el tropismo con el cual van a migrar. La diferenciación de los LiB a plasmoblasto, que es cuando la célula cambia de isotipo de Igs y adquiere la capacidad de secretar Acs, se correlaciona con un incremento en la expresión de CXCR4 y una disminución en la expresión de CXCR5 [243, 244]. En este sentido, pudimos observar que mientras los LiB presentan una alta expresión de CXCR5 y baja de CXCR4, los PL/CP presentan una baja expresión de CXCR5 y alta de CXCR4 (Fig. 16). La expresión de CXCR4 en los PL/CP les permite migrar hacia la pulpa roja del bazo o a médula ósea, en donde terminarían su diferenciación, siguiendo el tropismo del receptor por CXCL12 [243]. Claramente, hay varias diferencias fenotípicas entre los LiB y los PL/CP que involucran más que la expresión de PDL1 y que pueden explicar el por qué, a pesar de que los LiB estimulados *in vitro* expresan PDL1, no cumplen una función supresora.

#### **4.7] Localización EF de las CP PDL1<sup>+</sup>**

Las CP difieren en su vida media, localización y la calidad y cantidad de Acs que secretan [90]. Así, la respuesta EF constituye una ruta de diferenciación más rápida, relativamente menos controlada, que lleva al desarrollo de CP de corta vida que producen Acs de baja afinidad. Por otro lado, la respuesta de CG genera CP que persisten durante largos períodos de tiempo y que secretan Acs de alta afinidad y de un isotipo más

específico para el patógeno invasor [90]. El mantenimiento de las CP de corta vida parece depender de la existencia de un proceso inflamatorio [91] mientras que las CP de larga vida sobreviven en condiciones no-inflamatorias en la médula ósea. De hecho, las CP de larga vida son quiescentes, y persisten en el tiempo y producen Acs aún en ausencia de Ag [92, 93]. En nuestro modelo de infección experimental con *T. cruzi* observamos que las CP PDL1<sup>+</sup> aparecen muy temprano y muestran ubicación EF (Fig. 9 y 16), por lo que postulamos que las CP PDL1<sup>+</sup> son de vida media corta [90]. En la Fig. 16 se puede observar que las CP se ubican próximas a los LiT. Es posible que las CP generadas, en estrecho contacto con los LiT, ejerzan un papel regulador de la inmunidad a través de PDL1.

Datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio muestran que CP de médula ósea, generadas por la inmunización con un antígeno T-dependiente (en este caso son CP generadas a partir de CG), mostraron un bajo nivel o un nivel medio de expresión de PDL1 (datos no mostrados). Esto sugiere que diferentes poblaciones de CP, con diferente nivel de expresión de PDL1, tendrían diferentes capacidades regulatorias. Así las CP de corta vida, que son sostenidas por la inflamación, pueden regular un proceso inflamatorio, mientras que CP de larga vida cuya función principal es mantener la memoria inmunológica humoral y la producción de Acs por muchos años no cumplirían tal función. A partir de los resultados obtenidos en esta tesis surgen nuevos objetivos como el de identificar las características y funciones de diferentes poblaciones de CP; determinar si las CP con función regulatoria tienen la misma capacidad de secretar Acs que aquellas que no lo hacen; determinar la vida media de las CP regulatorias, ya que si viven mucho tiempo como las CP de larga vida serían deletéreas para el hospedador; identificar características fenotípicas y factores de transcripción que permitan diferenciar las diferentes poblaciones de CP y por último evaluar la presencia de estos tipos celulares en diferentes patologías autoinmunes y cáncer, particularmente en humanos. Los resultados obtenidos en esta tesis así como la respuesta a los nuevos objetivos, que se plantean a partir de ella, serán de gran utilidad para el conocimiento en inmunología básica y aplicada. Estos enfoques nos ayudarán a comprender mejor el funcionamiento normal del sistema inmunológico, así como poner en relieve nuevos blancos de intervención terapéutica para amortiguar la respuesta inmune.



**5**

**CONCLUSIONES**

## 5 CONCLUSIONES

---

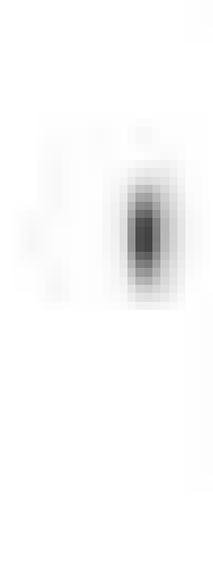
- Los ratones deficientes en LiB maduros infectados con *T. cruzi* presentan una prematura mortalidad en comparación a ratones WT infectados. Esto indica que los LiB son necesarios para sobrevivir a la infección con *T. cruzi*.
- Los ratones deficientes en LiB maduros son capaces de controlar la replicación del *T. cruzi* pero sucumben a la infección. Esto sugiere que ni la respuesta inmune dependiente de LiB ni la respuesta de Acs son imprescindibles para contener la replicación parasitaria pero estarían involucradas en el control de la inflamación.
- Los ratones muMT infectados con *T. cruzi*, en comparación a ratones WT infectados, presentaron un aumento significativo en la concentración plasmática de IFN $\gamma$  y TNF, sugiriendo que en ausencia de LiB la infección produce una exacerbación de la respuesta inmune pro-inflamatoria. Es decir que, en la infección con *T. cruzi*, los LiB y/o los PL/CP ejercerían una función regulatoria.
- Los ratones infectados, deficientes en LiB, presentan alteraciones clínicas y bioquímicas asociadas a elevados niveles de TNF en plasma, y una correlación entre la concentración de TNF y su mortalidad. El bloqueo de TNF promueve una recuperación inicial en el peso corporal, pero una mortandad por exacerbación de la respuesta pro-inflamatoria a tiempos tardíos.
- Ratones muMT infectados presentan LiT CD4 $^+$  con perfil inflamatorio, lo cual sugiere que los LiB son capaces de regular la población de LiT CD4 $^+$  en la infección con *T. cruzi*. Los LiT CD4 $^+$  son la mayoría de las células productoras de TNF. La transferencia de LiT CD4 $^+$  de ratones muMT a ratones WT infectados modificó el perfil de los LiT de ratones receptores, lo que indica que los LiT CD4 $^+$  que se inducen en ausencia de LiB influyen sobre otras poblaciones de LiT CD4 $^+$  favoreciendo un perfil pro-inflamatorio.
- Los LiB y PL/CP de los ratones infectados secretan diversas citoquinas, tales como IL10, TGF $\beta$  e IL6, y expresan moléculas con función inhibitoria como PDL1 y PDL2, las cuales aumentan su expresión con el transcurso de la infección.
- Los LiB generados durante la infección fueron capaces de regular células productoras de TNF *in vitro* a través de un mecanismo dependiente de contacto celular. Los PL/CP generadas durante la infección son capaces de regular células secretantes de TNF e IFN $\gamma$  *in vitro* presentes en esplenocitos de ratones infectados.

- La vía PD1/PDL1 está involucrada en la regulación, *in vitro*, de las células secretantes de TNF e IFN $\gamma$  en la infección con *T. cruzi*.
- PDL2 no participa en la regulación, *in vitro*, de células secretantes de TNF o de IFN $\gamma$  presentes en animales infectados con *T. cruzi*.
- La señalización vía el receptor para IL10 regula, *in vitro*, células secretantes de TNF en la infección con *T. cruzi*.
- En la infección con *T. cruzi* se generan PL/CP en focos EF que expresan CD11c, PDL1 y otros receptores asociados a funciones regulatorias como PDL2 y CD39.
- La expresión de PDL1 se induce *in vitro* en los LiB a través de estímulos como ligandos de Toll, el *T. cruzi* e IFN $\gamma$ . PL/CP generados tanto *in vitro* como *in vivo* presentaron la mayor expresión de PDL1.
- El solo aumento en la expresión de PDL1 no garantiza una función regulatoria en LiB o PL/CP. LiB o PL/CP PDL1<sup>+</sup> generados *in vitro* favorecieron la secreción de TNF e IFN $\gamma$ . En estas condiciones experimentales los LiB parecen tener más una función presentadora de Ag que una función supresora. Los LiB y PL/CP de los ratones infectados que ejercen una función regulatoria tienen un fenotipo particular, que no es expresado por sus equivalentes obtenidos *in vitro*. Los PL/CP de los ratones infectados expresan menos niveles de MHCII, y mayores niveles de PDL1 y CD39 que LiB estimulados *in vitro*.
- Los resultados analizados en conjunto muestran que las células secretantes de Acs, más allá de cumplir esta función, son capaces de regular una respuesta inflamatoria. Dilucidar si los PL/CP que ejercen función regulatoria tienen la misma capacidad de producir Acs que aquellas que no lo hacen y si esta función está circunscripta a PL/CP de corta o larga vida es motivo de futuras investigaciones.



**MATERIALES Y MÉTODOS**

**6** -----



### 6.1] Animales de Experimentación

Para los experimentos realizados en este trabajo de tesis se utilizaron ratones machos WT o genéticamente modificados que a continuación se detallan:

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

- **Ratones muMT** (B6.129S2-Ighmtm1Cgn/J), provenientes del Bioterio del Seattle Children's Reseach Institute (Seattle, EEUU) y endocriados en el Bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC, CIBICI-CONICET. Son ratones mutantes que carecen de LiB maduros y tienen el background genético C57BL/6. El defecto genético lleva a una falta de expresión de IgM en la membrana celular. Estos ratones originalmente fueron donados por Klaus Rajewsky a The Jackson Laboratories.

- **Ratones TLR2KO** (B6.129-Tlr2tm1Kir/J), fueron adquiridos en The Jackson Laboratories (EEUU) y endocriados en el Bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC, CIBICI-CONICET. Los ratones fueron generados por una mutación dirigida la cual impide la expresión de la proteína TLR2 y tienen el background genético C57BL/6. Los ratones fueron cedidos a The Jackson Laboratories por Carsten J. Kirschning (Technical University of Munich).

- **Ratones TLR4KO** (C57BL/10ScNJ), fueron adquiridos en The Jackson Laboratories (EEUU) y endocriados en el Bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC, CIBICI-CONICET. Los ratones poseen una mutación espontánea que los lleva a dar una respuesta defectuosa a la estimulación con LPS y tienen un background genético C57BL/10.

- **Ratones TNFRKO** (TNFRp55<sup>-/-</sup>), fueron provistos por la Dra. M Silvia di Genaro (UNSL) y endocriados en el Bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC, CIBICI-CONICET. Los ratones se generaron por mutación dirigida que afecta la expresión de la proteína p55 del receptor para TNF y en consecuencia la vía de señalización del receptor de TNF.

• **Ratones WT CD45.1** (B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ) fueron adquiridos en The Jackson Laboratories (EEUU). Estos ratones tienen el *background* genético C57BL/6 pero sus células hematopoyéticas expresan CD45.1 y pueden trazarse mediante el uso de Acs específicos. Las células de estos ratones son completamente funcionales y su comportamiento es comparable al de los animales WT.

En este trabajo de tesis se utilizaron principalmente ratones machos de 7-9 semanas de edad, criados en un ciclo de luz y oscuridad de 12 h. Los animales, como se menciona arriba, se mantuvieron en el Bioterio del CIBICI-CONICET el cual posee el número de aprobación del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (*National Institutes of Health-USA, NIH*): A5802-01. Para su cuidado, se siguieron las recomendaciones de la guía para el cuidado y uso de animales de experimentación, publicada por el Consejo Canadiense de Protección de los Animales y aprobada por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (resolución HCD 274/09 y 981/13). Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo estricta conformidad con las recomendaciones de la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del NIH. En el presente trabajo de tesis se sacrificaron alrededor de 650 ratones en total.

## 6.2] Reactivos

### 6.2.1] Reactivos Químicos empleados en cultivos celulares y otras metodologías

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

El agua *DNA ultrapure*, el *buffer* Tris-EDTA pH=8 y el TRIzol fueron adquiridos en Molecular Probes, Invitrogen (USA).

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

La heparina libre de aditivos de 5.000 U/mL fue provista por UENFAR (Alemania). Por otro lado, la Brefeldina, monensina y el kit de Buffers "*Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set*" empleados se obtuvieron de eBiosciences (EEUU). El fijador histológico fue adquirido en BioPure Diagnostic (Argentina). Los Kits para la determinación de ALT y glucosa fueron adquiridos en Wiener (Argentina), mientras que los reactivos de Bradford y

el Tween-20 se compraron en BioRad (EEUU). La empresa BD Biosciences (EEUU) nos proveyó TMB, los *buffers CytoFix/CytoPerm, Perm/Wash* y GolgiStop.

El ácido sulfúrico, el etanol, el cloroformo, el metanol, la hematoxilina, la eosina utilizados, fueron de las marcas Cicarelli (Argentina), Taurus (Argentina) y J.T.Backer Chemicals (EEUU); otros reactivos como cloruro de amonio, Tris, fosfato de sodio, cloruro de sodio, carbonato de sodio, glucosa fueron de marca Anedra (Nueva Zelanda).

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

### 6.2.2] Acs para Citometría de Flujo

Los experimentos desarrollados en el presente trabajo de tesis involucraron Acs conjugados a fluorocromos que se detallan a continuación.

Especificidad	Clon	Fluorocromos / Biotina (*)	Marca Comercial
CD19	eBio1D3	FITC, APCeFluor780	eBioscience
B220	RA3-6B2	FITC, PE, APC, PerCP	eBioscience
CD138	281-2	Biotin, APC	BD Bioscience
FAS	Jo2	PE, Biotin	BD Bioscience
GL7	GL7	Alexa Fluor 647	eBioscience
CD5	53-7.3	FITC	BD Bioscience
CD1d	1B1	PerCPCy5.5	eBioscience
CD3	145-2C11	FITC, PerCPCy5.5	eBioscience
CD4	GK1.5	APCeFluor780	eBioscience
CD8	53-6.7	PeCy7, PerCPCy5.5	eBioscience
Ly6G	1A8	PECy7	Biologend
Ly6C	HK1.4	Biotin / APC	eBioscience
CD11c	N418	FITC	Biologend
PD1	RMP1-30	PE, PECy7	Biologend, eBioscience
PDL1	MIH5	PE	eBioscience
PDL2	TY25	PE	eBioscience
CTLA4	UC10-4B9	PE	eBioscience
CD45.1	A20	Alexa Fluor 750, APCy7	BD Bioscience
CD45.2	104	PerCPCy5.5,	BD Bioscience
LAP1	TW7-16B4	PE, APC	Biologend
Foxp3	FJK-16s	PE	eBioscience
Tbet	4B10	Alexa Fluor 647	Biologend
IL10	JES5-16E3	PE, APC	eBioscience
IL17	TC11-18H10	PE	BD Bioscience
TNF	MP6-XT22	APC, PE, PerCP	BD Bioscience
IL6	MP5-20F3	PE, APC	Biologend
IFN $\gamma$	XMG1.2	PE, APC	BD Biosciences
Streptavidin	-	PerCPCy5.5, APC, PE	eBioscience

(\*) APC: Alofocianina; FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PECy7: Ficoeritrina conjugada con cianina; PerCP: Proteína clorofila peridina; PerCPCy5.5: Proteína clorofila peridina conjugada con cianina.

### **6.2.3] Acs neutralizantes de actividad biológica o de proteínas involucradas en señalización**

#### *Utilizados en ensayos In vitro*

- Ac bloqueante anti IL10R (Purified Rat Anti-Mouse CD210, Clon 1B1.3a, Biolegend).
- Ac bloqueante anti PDL1 (Purified Anti-Mouse 274, Clon MIH5, eBioscience)
- Ac bloqueante anti PDI (Purified Anti-Mouse 279, Clon J43, eBioscience)
- Ac bloqueante anti PDL2 (Purified Anti-Mouse CD273, Clon TY25 eBioscience)
- Control de Isotipo Rat IgG2a, kappa clon: eBR2a, eBioscience
- Control de isotipo Armenian Hamster IgG clon: eBio299Arm, eBioscience
- IgG1 de rata, utilizado como control de isotipo. Adquirido en Jackson Immuno Research (EEUU).

#### *Utilizados en ensayos In vivo*

- Ac anti TNF: Antisuero de rata IgG específico para TNF de ratón (clon XT3.11) provisto por BioXCell.
- IgG1 de rata, utilizado como control de isotipo. Adquirido en Jackson Immuno Research (EEUU).
- Ac IgG2a de rata: El Ac IgG2a de rata (control) fue adquirido en Jackson ImmunoResearch (EEUU).

### **6.2.4] Líneas Celulares**

Línea celular de fibroblastos NIH3T3 (NIH). Esta línea celular se estableció originalmente a partir de células de fibroblastos de embriones de ratón, que fueron cultivadas de acuerdo a un protocolo llamado "protocolo 3T3". Las células de fibroblastos eran transferidos (la "T") cada 3 días (el primer "3"), y se inoculaban a una densidad de  $3 \times 10^3$  células por placa de 20 cm<sup>2</sup> (el segundo "3") de forma continua. Las células inmortalizadas espontáneamente con una tasa de crecimiento estable se establecieron después de 20-30 generaciones en cultivo, y se denominaron células "3T3".

### 6.2.5] Antígenos del *T. cruzi* (AgTpY)

El AgTpY fue obtenido a partir de tripomastigotes vivos cepa Y-br, los cuales a su vez fueron obtenidos a partir del cultivo celular en células NIH3T3 (el protocolo de obtención de parásitos se describe más adelante). Los tripomastigotes fueron lavados dos veces en PBS (Gibco), con una velocidad de centrifugación de 4400rpm durante 20 minutos (min) y resuspendidos en 200-500ul de PBS estéril. La suspensión fue sonicada durante 10min, en agua destilada a 4°C. Luego se procedió a separar la solución en alícuotas, las cuales fueron almacenadas en freezer de -20°C hasta su uso. Cercano al tiempo de utilización de las alícuotas, se procede a su descongelamiento para cuantificar proteínas. La concentración de proteínas de la muestra fue estimada por el método de Bradford [245] utilizando el reactivo BioRad Protein Assay. Albumina sérica bovina fue utilizada como estándar

### 6.2.6] Reactivos de ELISA

Los reactivos para la determinación de citoquinas IFN $\gamma$ , IL12p40, IL6 e IL17A fueron provistos por eBiosciences (EEUU). Los kits para la determinación de IL10 y TNF fueron adquiridos en Biolegend. El kit para la determinación de TGF $\beta$  fue provisto por Invitrogen, y el kit para la determinación de IL1b fue de BD Biosciences. Todos los kits incluyeron: Acs de captura, citoquinas recombinantes, Acs biotinizados, y estreptavidina conjugada con peroxidasa. Las placas utilizadas para el ensayo fueron placas Costar *high binding half area* de la empresa Fisher scientific (EEUU).

### 6.2.7] Acs adosados a Perlas magnéticas y columnas para separación magnética de células

Los kits comerciales para purificación de células con Acs adosados a perlas magnéticas, Anti CD43 (Ly48) MicroBeads y Anti-CD4 (L3T4) MicroBeads fueron provistos por la empresa Miltenyi Biotec (EEUU), al igual que las columnas LS, el magneto y los adaptadores.

## 6.3] Parásitos e Infección

### 6.3.1] Mantenimiento y obtención de tripomastigotes de *T. cruzi*, cepa Y-br

Los tripomastigotes de la cepa Y-Br fueron obtenidos a partir de cultivos de la línea celular NIH3T3.  $5 \cdot 10^5$  células NIH3T3, fueron cultivadas durante una noche a 37°C en un Flask T25 (día 1). Al día siguiente las células, en una confluencia del 40-50%, fueron infectadas con  $1,7 \cdot 10^6$  tripomastigotes (día 2) y cultivadas otras 48 h a 37°C. Al día 4, el medio de cultivo fue cambiado y las células fueron colocadas a 34°C, con la tapa del flask cerrada para evitar el intercambio gaseoso. Al día 6-7 el sobrenadante fue recolectado, se

centrifugó 5min a 500rpm, y el sobrenadante obtenido (conteniendo a los parásitos) fue recuperado. La operación fue repetida para desechar debris celular y amastigotes. Posteriormente este mismo sobrenadante fue centrifugado 20min a 4400rpm, tras lo cual los parásitos se depositan en el fondo del tubo. El sobrenadante fue descartado y el pellet obtenido fue lavado con 1% de glucosa en PBS a 37°C y centrifugado 20min a 4400rpm. Finalmente los parásitos fueron resuspendidos en 1% de glucosa en PBS y contados en cámara de Neubauer. Los parásitos así recuperados se utilizaron tanto para continuar otro ciclo de infección de las células NIH3T3, como para infectar ratones.

### **6.3.2] Infección experimental con *T. cruzi* cepa Y-br**

Ratones C57BL/6 WT o genéticamente modificados, fueron infectados por vía intraperitoneal (ip.) con 10.000 tripomastigotes de la cepa Y-br suspendidos en 200uL de 1% glucosa en PBS. La dosis de parásito fue seleccionada de forma tal que la parasitemia alcanzada fuera máxima, permitiendo que los ratones WT sobrevivan la etapa aguda de infección y progresen a la cronicidad [246]. Según el caso, los animales fueron sacrificados a distintos tiempos de infección para realizar estudios en distintos órganos, o bien se controlaron periódicamente a fines de establecer su sobrevida, peso corporal y progresión a la infección. Ratones no infectados, inyectados con PBS, fueron procesados en paralelo y utilizados como control en muchos de los experimentos, según se indica en cada caso.

### **6.3.3] Determinación de la parasitemia**

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

### **6.3.4] Monitoreo de la infección aguda**

Los controles de sobrevida y del estado general de los ratones infectados fueron realizados generalmente cada 48h y cada 24h en tiempos cercanos al pico de parasitemia (día 9pi). Según las normas de cuidado de animales, los ratones que mostraron una pérdida del peso corporal de más del 25% del peso original fueron sacrificados.

## 6.4] Tratamientos *in vivo*

### 6.4.1] Tratamiento con Ac neutralizante de la actividad biológica de TNF

La citoquina TNF fue neutralizada *in vivo* mediante la inyección intraperitoneal de un Ac anti-TNF de rata (clon XT3.11 – BioXCell) siguiendo el siguiente esquema por ratón: 0,5mg los días 13 y 16pi; 0,75mg los días 20 y 23pi; 1mg los días 27 y 30pi. Este tratamiento se comenzó el día 13pi para permitir el efecto temprano de TNF, protector de la infección, y así evitar una mortalidad temprana por imposibilidad de controlar los parásitos. Las dosis de anti-TNF fueron administradas de manera creciente, ya que se observó un incremento de TNF en plasma en animales tratados con este Ac en experimentos iniciales. Como control, ratones infectados fueron inyectados con el mismo esquema con IgG1 de rata (Jackson ImmunoResearch). Los Acs inyectados fueron diluidos en 200uL finales de PBS estéril (GIBCO).

### 6.4.2] Transferencia adoptiva de LiT CD4<sup>+</sup>

LiT CD4<sup>+</sup> fueron purificados por selección positiva utilizando el kit de purificación para LiT CD4 de Miltenyi, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Los LiT CD4<sup>+</sup> se obtuvieron de bazos de ratones WT (CD45.2) o muMT a los 8 o 9 días pi según el caso (se indica en la leyenda correspondiente en la Fig.). La pureza de la población celular obtenida fue determinada por citometría de flujo utilizando Acs específicos para CD3 y CD4. Se trabajó con purezas entre 93 y 95%.

Los LiT CD4<sup>+</sup> esplénicos obtenidos fueron contados en una cámara de Neubauer y luego resuspendidos en PBS estéril. Posteriormente fueron centrifugados a 1800rpm durante 5min, y nuevamente resuspendidos en PBS estéril, generando una suspensión de  $3 \times 10^6$  células cada 100uL de PBS. A cada ratón receptor WT (CD45.1) se le inyectó un volumen de 100uL por vía endovenosa a través del seno retro orbital.

## 6.5] Muestras de sangre y plasma

### 6.5.1] Sangre

La sangre de ratones infectados, obtenida a diferentes tiempos de infección, y controles no infectados, fue recolectada de dos maneras diferentes:

1) A partir del seno venoso retro-orbital utilizando pipetas *Pasteur* de vidrio heparinizadas (con 10uL de heparina). Luego la sangre fue depositada en tubos tipo "eppendorf".

2) A partir de la vena de la cola, efectuando un corte en su porción terminal. Esta sangre se recolectó en tubos tipo "ependorf" que contenían 10uL de heparina.

El protocolo de sangrado fue elegido de acuerdo a cada situación experimental en particular. En caso de que el experimento requiriera que los ratones tuvieran su seno retro-orbital en perfectas condiciones, como es el caso de experimentos de transferencia adoptiva de células, se procedió a la obtención de muestras de sangre desde la vena de la cola. En ciertos casos el protocolo de sangrado fue mixto, utilizando ambos protocolos.

### **6.5.2] Plasma**

La sangre recolectada en los tubos de tipo "ependorf" fue centrifugada durante 8min a 3000 rpm y a continuación el plasma fue separado. Las muestras de plasma fueron colocadas en un nuevo tubo "ependorf" y conservadas en un freezer de -80°C hasta su análisis (determinaciones de citoquinas, glucosa o transaminasas hepáticas). Cabe señalar que las muestras de plasma obtenidas para determinar IL10, fueron procesadas en fresco, al momento de su obtención.

## **6.6] Obtención de Suspensiones celulares provenientes de diferentes órganos**

### **6.6.1] Células de bazo**

Una vez sacrificados los animales, sus diferentes órganos (bazo, ganglios linfáticos inguinales e hígado) fueron extraídos en condiciones de esterilidad. Los bazos fueron colocados sobre mallas metálicas de acero inoxidable alojadas dentro de cápsulas de Petri de 30mm conteniendo 3mL de PBS (GIBCO) al 2%SBF. Los órganos fueron disgregados mecánicamente utilizando émbolos estériles. La suspensión celular obtenida fue centrifugada y el pellet se trató por 5min con 2 ml de buffer de lisis (Lysing Buffer, Sigma) para producir la lisis de los glóbulos rojos. Luego las células fueron centrifugadas a 2000 rpm por 5min y lavadas 2 veces con solución fisiológica-SBF 2%. Finalmente las células se resuspendieron en PBS-SBF 2% y se mantuvieron en hielo hasta su uso. La cantidad de leucocitos viables se determinó contando, en cámara de Neubauer, una dilución de las células en el colorante vital Azul de Tripán (GIBCO).

### **6.6.1] Células de Hígado**

Al igual que las células de bazo, los hígados fueron disgregados en mallas metálicas de acero inoxidable con la utilización de émbolos. La suspensión celular obtenida fue centrifugada por 5min a 1800rpm y luego sometida a un gradiente de densidad de Percoll (Sigma) para la obtención de células mononucleares. Para ello, el precipitado celular fue

resuspendido en una solución de Percoll 35% (en RPMI) y colocado sobre una solución de Percoll 65% (en PBS Estéril), formando dos capas. Luego se procedió a la centrifugación del gradiente durante 25min a 600G a 25°C. Cabe destacar que se configuró la centrifuga sin aceleración y sin freno. Utilizando una pipeta Pasteur plástica estéril se retiró la capa correspondiente a hepatocitos (capa más superficial), y con una nueva pipeta se obtuvo la capa de leucocitos infiltrantes de hígado, localizada entre las capas de Percoll 35% y Percoll 65%; fácilmente distinguibles por la diferencia de color. Los leucocitos fueron colocados en un nuevo tubo y lavados, una vez, con 10mL de PBS-2%SBF y centrifugados a 1800rpm durante 5min.

Al igual que en bazo, los glóbulos rojos fueron lisados con 1 ml de buffer de lisis y posteriormente el pellet de células obtenido fue lavado dos veces. Por último, los leucocitos fueron resuspendidos en 1mL de PBS-SBF2% y conservados en hielo hasta su utilización. La cantidad de leucocitos viables se determinó contando, en cámara de Neubauer, una dilución de las células en el colorante vital Azul de Tripán (GIBCO).

#### **6.6.1] Células de Ganglios Linfáticos Inguinales**

Los ganglios linfáticos inguinales, al igual que los tejidos arriba mencionados, se colocaron sobre mallas metálicas de acero inoxidable en cápsulas de Petri de 30mm conteniendo 3mL de PBS-2%SBF. Las células fueron obtenidas siguiendo el mismo protocolo que para células esplénicas.

### **6.7] Cultivos celulares**

#### **6.7.1] Cultivos primarios**

Para cultivo celular, las suspensiones celulares fueron centrifugadas y resuspendidas en RPMI completo (RPMI al 10% de SBF, 2mM de L-glutamina, y 40µg/mL de gentamicina). Según las particularidades de cada experimento, las células se cultivaron a lo largo de un número variable de tiempo, en medio solo o en presencia de distintos estímulos. Los cultivos se hicieron a una atmósfera constante de 5% de CO<sub>2</sub> y 37 °C.

##### **▪ Estimulación de células para la determinación de citoquinas intracelulares/LAP1**

Las células ( $5 \times 10^6$ /mL) fueron cultivadas en placas de 96 reservorios con fondo en U, durante 5h, con PMA (50ng/mL, Sigma); Ionomicina (500ng/mL, Sigma), Brefeldina A (1/1000, eBiosciences) o monensina (1/1000, eBiosciences). Posteriormente fueron recuperadas e incubadas con Acs contra diferentes citoquinas (ver esquema de marcación más adelante).

• *Ensayos de depleción celular con Acs adosados a perlas magnéticas*

Células de bazo de ratones con 13 días de infección fueron obtenidas. Se procedió a la purificación de LiB por medio de un kit que utiliza Acs adosados a perlas magnéticas. Estos Acs son específicos para CD43, y dado que esta molécula no se expresa en los LiB, pero sí en el resto de las poblaciones celulares, se obtuvo por selección negativa la fracción celular correspondiente a los LiB. Por otra parte, por selección positiva, se procedió a la purificación de la fracción NoB, es decir, todas las células presentes en los esplenocitos a excepción de los LiB. El protocolo utilizado fue el descrito por el fabricante (Miltenyi Biotec). La pureza de la población de LiB obtenida y la contaminación de la fracción NoB fue determinada por citometría de flujo utilizando Acs anti- B220 y CD19 para identificar LiB. Poblaciones de LiB con pureza mayor al 80%, y fracciones NoB con contaminaciones menores al 10% fueron utilizadas. La viabilidad fue mayor al 95% determinada por exclusión con Azul de Tripán.

Las poblaciones celulares obtenidas fueron cultivadas en RPMI completo, colocando  $2,5 \times 10^5$  células NoB,  $2,5 \times 10^5$  LiB, o en el co-cultivo  $2,5 \times 10^5$  NoB +  $2,5 \times 10^5$  LiB, por reservorio, en una placa de 96 reservorios con fondo chato. Las células fueron cultivadas con medio solo o con AgTpY ( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), en presencia de Acs anti-PDL1 ( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) o de un Ac control ( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Con el fin de evitar el contacto entre células, algunos cultivos fueron realizados utilizando un transwell (membrana Anopore, con poros de  $0,2 \mu\text{m}$ , Thermo Scientific Nunc), en donde los LiB fueron colocados dentro del transwell y la población de células NoB en el reservorio de la placa. Luego de 48h de cultivo, las citoquinas presentes en los sobrenadantes de cultivo fueron cuantificadas por ELISA.

• *Ensayos de depleción celular por "Cell-Sorting"*

Células de bazo de ratones, con 13 días de infección, fueron obtenidas e incubadas con Acs dirigidos contra proteínas de la superficie de LiB marcadas con fluorocromos. Posteriormente las células fueron adquiridas en un "Cell sorter" y fueron desprovistas de diferentes tipos celulares utilizando distintas estrategias de gate. Así, se obtuvieron poblaciones celulares sin LiB, sin CP, sin células PDL1<sup>high</sup> o PDL1<sup>low</sup>.

Luego del "sort", en las poblaciones obtenidas se determinó el porcentaje de células NoB haciendo un análisis de la población CD19<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>CD138<sup>-</sup>. Luego del recuento del total de la población obtenida, se determinó el número de células NoB, y se realizó la dilución en RPMI completo, de tal forma de colocar  $2,5 \times 10^5$  células NoB por reservorio, en una placa de 96 reservorios con fondo en U.

Las poblaciones celulares obtenidas fueron cultivadas en RPMI completo con AgTpY ( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), y en presencia de Acs anti-PDL1, o anti-PD1, o anti- PDL2, o anti-

IL10R (5 $\mu$ g/mL) y sus correspondientes Acs controles (5 $\mu$ g/mL). Luego de 48h de cultivo, las citoquinas presentes en los sobrenadantes de cultivo fueron cuantificadas por ELISA.

▪ **Cultivo de LiB frente a diferentes estímulos y posterior evaluación de la expresión de PDL1**

LiB esplénicos fueron obtenidos, como describimos arriba, por selección negativa utilizando Acs anti-CD43 asociados a perlas magnéticas. Se trabajó con una pureza de la población de alrededor de 93%. Los LiB fueron resuspendidos en RPMI completo, de tal forma de colocar 1x10<sup>6</sup> LiB por reservorio en una placa de 96 reservorios con fondo en U y cultivados con LPS (5 $\mu$ g/mL), CpG-ODN (1 $\mu$ g/mL), AgTpY (5 $\mu$ g/mL), tripomastigotes vivos de *T. cruzi* cepa Y-br en proporción 1:1 con los LiB, IFN $\gamma$  (50ng/mL), TNF (100ng/mL), TGF $\beta$  (10ng/mL). Los LiB cultivados en ausencia o presencia de estímulo durante 24 o 72h, según se indica en la leyenda de la Figura correspondiente fueron traspasados a los tubos de citometría. Allí, los LiB fueron lavados con 3mL de PBS-2%SBF, centrifugados 5min a 1800rpm y teñidos con anti-CD19, B220, CD138, y PDL1 marcados con fluorocromo y analizados por citometría de flujo.

▪ **Ensayos de activación y diferenciación de LiB**

LiB provenientes de esplenocitos de ratones WT no infectados fueron purificados por selección negativa con anti-CD43 asociado a perlas magnéticas, como previamente mencionamos. Se trabajó con LiB con una pureza de alrededor del 93%.

Los LiB fueron resuspendidos en RPMI completo, en una dilución 5x10<sup>6</sup>/mL. Para los diferentes ensayos se utilizaron placas de 6 o 12 reservorios.

Los LiB fueron estimulados durante 48h de la siguiente manera:

- (1) AgTpY (5 $\mu$ g/mL)
- (2) AgTpY (5 $\mu$ g/mL) + LPS (10 $\mu$ g/mL) + IFN $\gamma$  (50ng/mL)
- (3) AgTpY (5 $\mu$ g/mL) + tripomastigotes de *T. cruzi* en proporción 1:1 con los LiB

Al cabo de las 48h de cultivo, los LiB estimulados fueron transferidos a un tubo de tipo "falcon" estéril, y lavados con RPMI completo agregando 10mL de RPMI completo y centrifugándolos 5min a 1800rpm. Posteriormente las células fueron contadas y sembradas en una placa de 96 reservorios con fondo en U, a una densidad de 2.5x10<sup>5</sup> por reservorio.

La fracción NoB se purificó a partir de esplenocitos de ratones infectados con 13 de infección y por selección positiva utilizando Acs específicos para CD43 unidos a perlas magnéticas. Las células fueron lavadas y contadas y colocadas a una densidad de 2.5x10<sup>5</sup> células por reservorio, en los reservorios que ya contenían los LiB estimulados. Luego de

48h de cultivo se cuantificaron las citoquinas presentes en los sobrenadantes de cultivo por ELISA.

### **6.7.2] Cultivo de la Línea celular de fibroblastos NIH3T3**

Esta línea celular fue mantenida en cultivo con DMEM suplementado con 10% SBF (Natocor) y 0,002M de L-glutamina, hasta alcanzar un 85% de confluencia (en estufa a 37°C y a una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>). Para su repique las células fueron incubadas con Tripsin-EDTA 0,25% (Gibco) durante 3min. Luego, para neutralizar la tripsina y lavar las células, se agregó medio completo.

## **6.8] Purificación de poblaciones celulares**

### **6.8.1] Cell sorting**

Las suspensiones de esplenocitos obtenidos según el procedimiento descrito previamente, fueron centrifugadas y lavadas dos veces con MACS buffer (PBS suplementado con 2mM de EDTA y 0,5% de SBF y filtrado con filtro 0,22µm). Posteriormente, las células fueron contadas con Azul de Tripán en cámara de Neubauer y diluidas a una densidad de 500x10<sup>6</sup> de células/mL en MACS buffer. Esta suspensión celular fue incubada con Acs específicos para la población de interés, marcados con fluorocromos, a 4 °C por 20min. Transcurrido ese tiempo, las células fueron lavadas 2 veces con MACS buffer, resuspendidas en una densidad de 50x10<sup>6</sup> células/mL en el mismo buffer y filtradas con un cell strainer de 0,40µm (Falcon Corning Brand, EEUU) para evitar agregados celulares. Las poblaciones de interés fueron obtenidas por fluorescence-activated cell sorting en un equipo FACSAria Cell Sorter (BD Biosciences). Las células purificadas fueron recolectadas en tubos estériles conteniendo 1-2 mL de RPMI completo con una concentración doble de SBF y gentamicina (20% y 40µg/mL respectivamente). En todos los casos la pureza de las poblaciones fue mayor al 97%. Tras 2 lavados, las células fueron resuspendidas en 2mL de RPMI completo a una concentración doble de gentamicina (40µg/mL) y colocadas 30min en estufa a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo, se cuantificaron las células viables contando en cámara de Neubauer con el colorante vital Azul de Tripán.

### **6.8.2] Acs adosados a Perlas magnéticas**

Una vez obtenidas las células de bazo según procedimientos descritos previamente la purificación de LiB fue realizada por selección negativa, utilizando el kit CD43 (Ly48) (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los LiT CD4<sup>+</sup> fueron

purificados por selección positiva, utilizando el kit Anti-CD4 (L3T4) (Miltenyi Biotec), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 6.8.3] Purificación de poblaciones celulares por selección positiva

Para la purificación de células por selección positiva realizamos el mismo tipo de método descrito en los ensayos de depleción celular *in vitro*, como son el cell sorting y la purificación con Acs adosados a perlas magnéticas.

## 6.9] Citometría de flujo

### 6.9.1] Marcación de superficie

Las distintas poblaciones celulares ( $5 \times 10^6$  células) fueron incubadas por 20min a  $4^\circ\text{C}$  con diferentes Acs marcados con PE, FITC, APC, PECy7, PerCPCy5,5 o biotina, diluidos en buffer de lavado (PBS- SBF 2%) a un volumen final de 30ul. Luego, las células fueron lavadas y una tercera incubación de 30min con estreptavidina marcada con fluorocromos (APC o PerCPCy5.5) fue realizada cuando se utilizaron Acs marcados con biotina. Finalmente, las células fueron resuspendidas en buffer de adquisición (FACS Flow, BD Bioscience), adquiridas en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) y analizadas con el software FlowJo.

### 6.9.2] Determinación de moléculas intracelulares por citometría de flujo

#### ▪ Citoquinas Intracelulares

La determinación de citoquinas intracelulares se realizó por citometría de flujo luego del cultivo de 5h (en presencia o ausencia de estímulos) con inhibidores del transporte vesicular (monensina o brefeldina A). Los estímulos utilizados se especifican en las leyendas de las figuras y en la sección "Cultivos Celulares". Transcurridas 5 h de cultivo, las células fueron lavadas y fijadas y permeabilizadas con los buffers comerciales Cytotfix/Cytoperm y Perm/Wash (BD Biosciences), siguiendo instrucciones del fabricante. La tinción con los Acs específicos tanto para moléculas de superficie como intracelulares, se hizo a temperatura ambiente en Perm/Wash, por un período de 30min. Tras un último lavado, las células se resuspendieron en PBS-SBF 2% y fueron adquiridas en el citómetro de flujo.

#### ▪ Factores de transcripción *Foxp3* y *Tbet*

La determinación de los factores de transcripción se realizó también por citometría de flujo. Luego de procesar los esplenocitos de acuerdo a lo indicado, las células fueron teñidas para moléculas de superficie, y luego del último lavado, fueron fijadas y

permeabilizadas con los buffers comerciales "Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set" (eBiosciences), siguiendo instrucciones del fabricante. La tinción con los Acs específicos para factores de transcripción, se hizo a temperatura ambiente en Perm/Wash, por un periodo de 40min. Tras un último lavado, las células se resuspendieron en PBS-SBF 2% y fueron adquiridas en el citómetro de flujo.

## **6.10] Determinación de diferentes proteínas en sobrenadantes de cultivos, plasma y lisados celulares**

### **6.10.1] Cuantificación de la actividad de transaminasas hepáticas GPT y glucosa**

La actividad de transaminasas hepáticas en plasma de animales infectados y normales fue evaluada utilizando el kit Transaminasas 200 (Wiener Lab.), siguiendo instrucciones del fabricante. De igual modo, la concentración de glucosa en el plasma de los grupos experimentales se realizó utilizando el kit Glicemia enzimática AA (Wiener Lab.).

### **6.10.2] Cuantificación de citoquinas por ELISA**

La determinación de citoquinas en sobrenadantes de cultivo o plasmas fue realizada utilizando kits de ELISA comerciales, según especificaciones del fabricante. Brevemente, placas de 96 pocillos *high binding* fueron sensibilizadas a 4°C durante la noche con 25uL de una dilución del Ac de captura en el buffer de sensibilización apropiado para cada analito (buffer carbonato pH 9,6; buffer fosfato pH 9; o PBS pH 7,2). Posteriormente y luego de 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0,05%, las placas fueron bloqueadas con 100uL PBS al 10% de SBF durante 2h a temperatura ambiente, en una cámara húmeda. Después, el buffer fue descartado y la placa fue lavada 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, 25uL de las muestras (puras o diluidas) y de diluciones seriadas del testigo fueron sembradas sobre la placa e incubadas durante toda la noche a 4°C, o 2h a temperatura ambiente, en una cámara húmeda. Seguidamente, las placas fueron lavadas 5 veces e incubadas 1,5h a temperatura ambiente con 25uL de Ac secundario conjugado a biotina diluido en buffer de bloqueo. Posterior a 5 nuevos lavados, 25uL de estreptavidina conjugada a peroxidasa fueron agregados e incubados 25min a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 5 veces y se incubaron con 40uL del reactivo de color TMB (BD Biosciences), conteniendo el sustrato de la enzima y el cromógeno. Entre 5 y 30min luego de la incubación, la reacción se inactivó con ácido sulfúrico 2N y se midió la absorbancia a 450nm en un lector de placas.

### 6.10.3] Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas del AgTpY se determinó por la técnica de Bradford, utilizando el kit *Bio-Rad Protein Assay*. Se utilizaron diluciones de ASB como testigo.

## 6.11] Ensayos de biología molecular

### 6.11.1] Extracción de ADN

La extracción de ADN de tejido (bazo, hígado, corazón) fue realizada a partir de secciones de los órganos obtenidos de ratones infectados, que se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. El ADN total fue extraído empleando reactivo de TRIzol (Life Technologies) según instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras fueron homogeneizadas mecánicamente en 1mL de TRIzol. Posteriormente, 0,2mL de cloroformo fue agregado por cada 1mL de TRIzol, y la fase fenol-cloroformo y la interfase conteniendo el ADN fueron conservadas. Tras su precipitación con 0,3mL etanol al 100%, el ADN fue lavado dos veces con una solución de citrato de sodio/etanol (0,1M citrato de sodio en 10% de etanol, pH=8,5) y luego una vez con etanol al 75%. Finalmente, el ADN fue resuspendido en buffer Tris-EDTA pH=8. Las concentraciones de ADN fueron determinadas por espectrofotometría, midiendo absorbancia a 260nm en BIO TEK *microplate spectrophotometer* (BioTek Instruments, Inc.).

### 6.11.2] PCR en tiempo real

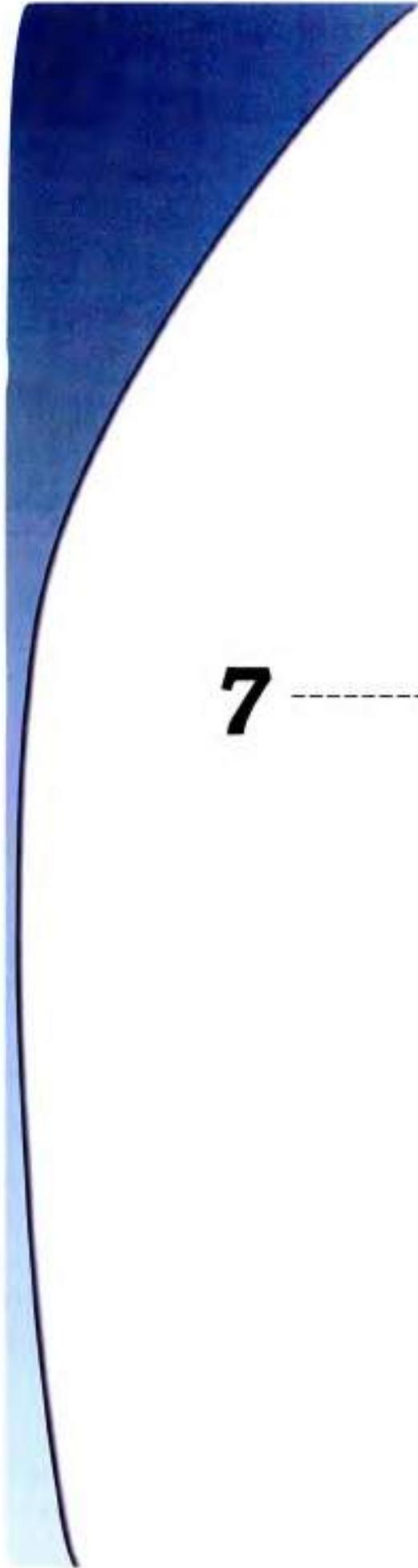
La técnica de PCR en tiempo real se utilizó para cuantificación de ADN de *T. cruzi*. Los cebadores o *primers* de secuencia personalizada (Applied Biosystem) específicos para ADN satélite de *T. cruzi* (GenBank AY520036), fueron diseñados según resultados publicados por Piron y col. [247] y asociados a sondas o *probes* tipo TaqMan. La cantidad de ADN de parásito se relativizó a GAPDH, utilizando TaqMan *Rodent GAPDH control Reagent* (Applied Biosystem). Las sondas estuvieron conjugadas a FAM (6-carboxifluoresceína) y utilizaron TMRA (tetrametilrodamina) como colorante *quencher*. El secuenciador utilizado fue ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Perkin-Elmer Applied Biosystem) y el procedimiento respetó las instrucciones del fabricante para ensayos con sondas *probe* tipo TaqMan. El análisis de los resultados se realizó con el software StepOne. Los ciclos umbrales (Ct por sus siglas en inglés, *Cycle threshold*) fueron definidos como el número de ciclos requeridos para alcanzar un umbral de fluorescencia, arbitrariamente fijado en etapas, donde el logaritmo de la señal se aproximaba a una recta (fase de expansión logarítmica). Se graficó la cantidad relativa del gen target según la fórmula  $2^{\Delta\text{Ct}}$  ajustada a unidades relativas, donde  $\Delta\text{Ct}$  es la relación entre el Ct del gen target y el Ct del gen *housekeeping* o control.

## **6.12] Estudios histológicos**

Los hígados obtenidos de ratones WT o muMT, controles o infectados con *T. cruzi* obtenidos a diferentes tiempos pi fueron fijados en formaldehído y embebidos en parafina. Secciones de 5  $\mu$ m de espesor fueron examinadas por microscopía de luz después de la tinción con hematoxilina / eosina. La evaluación, a doble ciego, de los daños en el hígado se centró en tres aspectos principales: la presencia y el tipo de infiltrado inflamatorio, la presencia y extensión de áreas necróticas y degeneración hialina y presencia de alteraciones celulares como vacuolización, hinchazón, alteraciones nucleares, etc. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio Nikon Eclipse TE 2000 U equipado con una video cámara digital.

## **6.13] Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 5.0. Según el tipo de comparaciones y el diseño del experimento, se utilizaron los siguientes análisis: T de Student, ANOVA de una o dos vías seguidos del post test de Bonferroni, ANOVA de muestras repetidas, con post test de Bonferroni o de Dunnett, y el test de Gehan-Breslow-Wilcoxon.



**7**

**BIBLIOGRAFÍA**

---

1. Golgher, D. and R.T. Gazzinelli, *Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease*. *Autoimmunity*, 2004. **37**(5): p. 399-409.
2. Dutra, W.O., et al., *Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009. **104** Suppl 1: p. 208-18.
3. Cardillo, F., et al., *Regulation of Trypanosoma cruzi infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells*. *Infect Immun*, 1996. **64**(1): p. 128-34.
4. Une, C., J. Andersson, and A. Orn, *Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with Trypanosoma cruzi*. *Clin Exp Immunol*, 2003. **134**(2): p. 195-201.
5. Guilmot, A., et al., *Monocytes play an IL-12-dependent crucial role in driving cord blood NK cells to produce IFN-g in response to Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013. **7**(6): p. e2291.
6. Rottenberg, M., et al., *Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to Trypanosoma cruzi infection*. *Scand J Immunol*, 1988. **28**(5): p. 573-82.
7. Tarleton, R.L., et al., *Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to Trypanosoma cruzi infection*. *Nature*, 1992. **356**(6367): p. 338-40.
8. Rottenberg, M.E., et al., *Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with Trypanosoma cruzi or Trypanosoma brucei*. *Infect Immun*, 1993. **61**(12): p. 5129-33.
9. Tarleton, R.L., M.J. Grusby, and L. Zhang, *Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 2000. **165**(3): p. 1520-5.
10. Holscher, C., et al., *Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of Trypanosoma cruzi-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase*. *Infect Immun*, 1998. **66**(3): p. 1208-15.
11. Silva, J.S., et al., *Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to Trypanosoma cruzi infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages*. *Infect Immun*, 1995. **63**(12): p. 4862-7.
12. Rodrigues, M.M., M. Ribeiro, and S.B. Boscardin, *CD4 Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate Trypanosoma cruzi through a nitric oxide dependent mechanism*. *Immunol Lett*, 2000. **73**(1): p. 43-50.
13. Kulkarni, M.M., et al., *Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT-1) plays a critical role in control of Trypanosoma cruzi infection*. *Immunology*, 2015. **145**(2): p. 225-31.
14. Abrahamsohn, I.A. and R.L. Coffman, *Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection*. *Exp Parasitol*, 1996. **84**(2): p. 231-44.
15. Abel, L.C., et al., *Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to Trypanosoma cruzi infection*. *J Autoimmun*, 2001. **17**(1): p. 99-107.
16. Sousa, G.R., et al., *Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e87082.
17. Hunter, C.A., et al., *IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 1997. **158**(7): p. 3311-6.

18. Holscher, C., et al., *Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in Trypanosoma cruzi-infected interleukin 10-deficient mice*. *Infect Immun*, 2000. **68**(7): p. 4075-83.
19. Tosello Boari, J., et al., *IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during Trypanosoma cruzi infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils*. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(4): p. e1002658.
20. 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.
21. Kierszenbaum, F. and J.G. Howard, *Mechanisms of resistance against experimental Trypanosoma cruzi infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice*. *J Immunol*, 1976. **116**(5): p. 1208-11.
22. Krettli, A.U. and Z. Brener, *Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections*. *J Immunol*, 1976. **116**(3): p. 755-60.
23. Rodriguez, A.M., et al., *Trypanosoma cruzi infection in B-cell-deficient rats*. *Infect Immun*, 1981. **31**(2): p. 524-9.
24. Kierszenbaum, F., *Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003. **37**(1): p. 1-11.
25. Tarleton, R.L., *Chagas disease: a role for autoimmunity?* *Trends Parasitol*, 2003. **19**(10): p. 447-51.
26. Rosser, E.C. and C. Mauri, *Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function*. *Immunity*, 2015. **42**(4): p. 607-612.
27. Fillatreau, S., *Regulatory plasma cells*. *Curr Opin Pharmacol*, 2015. **23**: p. 1-5.
28. Shen, P., et al., *IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases*. *Nature*. **507**(7492): p. 366-70.
29. Neves, P., et al., *Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during Salmonella typhimurium infection*. *Immunity*. **33**(5): p. 777-90.
30. Matsumoto, M., et al., *Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation*. *Immunity*, 2014. **41**(6): p. 1040-51.
31. Bermejo, D.A., et al., *Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors RORgammat and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells*. *Nat Immunol*. **14**(5): p. 514-22.
32. Riarte, A., et al., *Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989-1996*. *Clin Infect Dis*, 1999. **29**(3): p. 561-7.
33. Kalil, J. and E. Cunha-Neto, *Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last?* *Parasitol Today*, 1996. **12**(10): p. 396-9.
34. Engman, D.M. and J.S. Leon, *Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity*. *Acta Trop*, 2002. **81**(2): p. 123-32.
35. Olivares-Villagomez, D., et al., *Polymerase chain reaction amplification of three different Trypanosoma cruzi DNA sequences from human chagasic cardiac tissue*. *Am J Trop Med Hyg*, 1998. **59**(4): p. 563-70.
36. Diazgranados, C.A., et al., *Chagasic encephalitis in HIV patients: common presentation of an evolving epidemiological and clinical association*. *Lancet Infect Dis*, 2009. **9**(5): p. 324-30.
37. Rassi Jr, A., A. Rassi, and J.A. Marin-Neto, *Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009. **104 Suppl 1**: p. 152-8.
38. Teixeira, A.R., et al., *Chagas disease*. *Postgrad Med J*, 2006. **82**(974): p. 788-98.
39. Fernandez, A., M. Hontebeyrie, and G. Said, *Autonomic neuropathy and immunological abnormalities in Chagas' disease*. *Clin Auton Res*, 1992. **2**(6): p. 409-12.

40. Fedoseyeva, E.V., et al., *De novo autoimmunity to cardiac myosin after heart transplantation and its contribution to the rejection process*. J Immunol, 1999. **162**(11): p. 6836-42.
41. Chiale, P.A. and I. Ferrari, *Autoantibodies in Chagas' cardiomyopathy and arrhythmias*. Autoimmunity, 2001. **34**(3): p. 205-10.
42. Kierszenbaum, F., *Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease?* Trends Parasitol, 2005. **21**(11): p. 513-6.
43. Levin, M.J. and J. Hoebcke, *Cross-talk between anti-beta1-adrenoceptor antibodies in dilated cardiomyopathy and Chagas' heart disease*. Autoimmunity, 2008. **41**(6): p. 429-33.
44. Gutteridge, W.E., M. Gaborak, and B. Cover, *Comparative study of SQ 18 506 with other nitroheterocyclic compounds on experimental Chagas' disease*. Ann Trop Med Parasitol, 1978. **72**(4): p. 339-47.
45. Rowland, E.C. and R.E. Kuhn, *Suppression of cellular responses in mice during Trypanosoma cruzi infections*. Infect Immun, 1978. **20**(2): p. 393-7.
46. Minoprio, P.M., et al., *Polyclonal lymphocyte responses to murine Trypanosoma cruzi infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses*. Scand J Immunol, 1986. **24**(6): p. 661-8.
47. Minoprio, P.M., et al., *Polyclonal lymphocyte responses to murine Trypanosoma cruzi infection. II. Cytotoxic T lymphocytes*. Scand J Immunol, 1986. **24**(6): p. 669-79.
48. Minoprio, P., et al., *Suppression of polyclonal antibody production in Trypanosoma cruzi-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies*. J Immunol, 1987. **139**(2): p. 545-50.
49. Savino, W., et al., *Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to Trypanosoma cruzi*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(1-2): p. 107-24.
50. Tarleton, R.L., *Immune system recognition of Trypanosoma cruzi*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(4): p. 430-4.
51. Kayama, H. and K. Takeda, *The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection*. Microbes Infect, 2010. **12**(7): p. 511-7.
52. Dutra, W.O. and K.J. Gollob, *Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease*. Curr Opin Infect Dis, 2008. **21**(3): p. 287-92.
53. Campos, M.A., et al., *Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with Trypanosoma cruzi in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1711-8.
54. Bafica, A., et al., *Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3515-9.
55. Oliveira, A.C., et al., *Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against Trypanosoma cruzi in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice*. PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000870.
56. Caetano, B.C., et al., *Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with Trypanosoma cruzi*. J Immunol, 2011. **187**(4): p. 1903-11.
57. Santiago, H.C., et al., *Mice deficient in LRG-47 display enhanced susceptibility to Trypanosoma cruzi infection associated with defective hemopoiesis and intracellular control of parasite growth*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 8165-72.
58. Lieke, T., et al., *NK cells contribute to the control of Trypanosoma cruzi infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms*. Infect Immun, 2004. **72**(12): p. 6817-25.
59. Vespa, G.N., F.Q. Cunha, and J.S. Silva, *Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro*. Infect Immun, 1994. **62**(11): p. 5177-82.

60. Gazzinelli, R.T., et al., *The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against Trypanosoma cruzi involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta*. Eur J Immunol, 1992. **22**(10): p. 2501-6.
61. Zurawski, G. and J.E. de Vries, *Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells*. Immunol Today, 1994. **15**(1): p. 19-26.
62. Saefel, M., B. Fleischer, and A. Hoerauf, *Stage-dependent role of nitric oxide in control of Trypanosoma cruzi infection*. Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2252-9.
63. Galvao Da Silva, A.P., J.F. Jacysyn, and I. De Almeida Abrahamssohn, *Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to Trypanosoma cruzi infection but fail to mount a T helper type 2 response*. Immunology, 2003. **108**(2): p. 230-7.
64. Dhiman, M. and N.J. Garg, *P47phox<sup>-/-</sup> mice are compromised in expansion and activation of CD8<sup>+</sup> T cells and susceptible to Trypanosoma cruzi infection*. PLoS Pathog, 2014. **10**(12): p. e1004516.
65. Silva, J.S., F.S. Machado, and G.A. Martins, *The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease*. Front Biosci, 2003. **8**: p. s314-25.
66. Kotsias, F., et al., *Reactive oxygen species production in the phagosome: impact on antigen presentation in dendritic cells*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(6): p. 714-29.
67. Lam, G.Y., J. Huang, and J.H. Brumell, *The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity*. Semin Immunopathol, 2010. **32**(4): p. 415-30.
68. da Matta Guedes, P.M., et al., *IL-17 produced during Trypanosoma cruzi infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(2): p. e604.
69. Miyazaki, Y., et al., *IL-17 is necessary for host protection against acute-phase Trypanosoma cruzi infection*. J Immunol, 2010. **185**(2): p. 1150-7.
70. Padilla, A.M., J.M. Bustamante, and R.L. Tarleton, *CD8<sup>+</sup> T cells in Trypanosoma cruzi infection*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(4): p. 385-90.
71. Tzelepis, F., et al., *Infection with Trypanosoma cruzi restricts the repertoire of parasite-specific CD8<sup>+</sup> T cells leading to immunodominance*. J Immunol, 2008. **180**(3): p. 1737-48.
72. Bustamante, J.M., L.M. Bixby, and R.L. Tarleton, *Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8<sup>+</sup> T central memory response in chronic Chagas disease*. Nat Med, 2008. **14**(5): p. 542-50.
73. Talvani, A., et al., *Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in chagasic cardiomyopathy*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004. **99**(6): p. 645-9.
74. Gomes, J.A., et al., *Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response*. Infect Immun, 2003. **71**(3): p. 1185-93.
75. Reis, D.D., et al., *Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha<sup>+</sup> cells and dominance of granzyme A<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> lymphocytes*. Am J Trop Med Hyg, 1993. **48**(5): p. 637-44.
76. Higuchi, M.D., et al., *Association of an increase in CD8<sup>+</sup> T cells with the presence of Trypanosoma cruzi antigens in chronic, human, chagasic myocarditis*. Am J Trop Med Hyg, 1997. **56**(5): p. 485-9.
77. Chandrasekar, B., et al., *Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy*. Am J Pathol, 1998. **152**(4): p. 925-34.
78. Dutra, W.O., et al., *Immunoregulatory networks in human Chagas disease*. Parasite Immunol, 2014. **36**(8): p. 377-87.
79. D'Imperio Lima, M.R., et al., *Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with Trypanosoma cruzi*. Eur J Immunol, 1985. **15**(2): p. 201-3.

80. Montes, C.L., et al., *A Trypanosoma cruzi alkaline antigen induces polyclonal B-cell activation of normal murine spleen cells by T-cell-independent, BCR-directed stimulation*. Scand J Immunol, 1999. **50**(2): p. 159-66.
81. Reina-San-Martin, B., et al., *A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase*. Nat Med, 2000. **6**(8): p. 890-7.
82. Bermejo, D.A., et al., *Trypanosoma cruzi infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies*. Immunology, 2011. **132**(1): p. 123-33.
83. Spinella, S., P. Liegeard, and M. Hontebeyrie-Joskowicz, *Trypanosoma cruzi: predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease*. Exp Parasitol, 1992. **74**(1): p. 46-56.
84. Brener, Z. and R.T. Gazzinelli, *Immunological control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease*. Int Arch Allergy Immunol, 1997. **114**(2): p. 103-10.
85. Malchiodi, E.L., et al., *Identity of the major cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi and an antigen (Ag163B6) isolated with a monoclonal antibody*. Immunol Lett, 1993. **35**(1): p. 59-62.
86. Cazorla, S.I., et al., *Prime-boost immunization with cruzipain co-administered with MALP-2 triggers a protective immune response able to decrease parasite burden and tissue injury in an experimental Trypanosoma cruzi infection model*. Vaccine, 2008. **26**(16): p. 1999-2009.
87. Pereira-Chioccolla, V.L., et al., *Comparison of antibody and protective immune responses against Trypanosoma cruzi infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein*. Parasite Immunol, 1999. **21**(2): p. 103-10.
88. Franchin, G., et al., *Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent epitope on the surface of Trypanosoma cruzi trypomastigotes reduces infection in mice*. Infect Immun, 1997. **65**(7): p. 2548-54.
89. Zuniga, E., et al., *Depletion of immature B cells during Trypanosoma cruzi infection: involvement of myeloid cells and the cyclooxygenase pathway*. Eur J Immunol, 2005. **35**(6): p. 1849-58.
90. Oracki, S.A., et al., *Plasma cell development and survival*. Immunol Rev, 2010. **237**(1): p. 140-59.
91. MacLennan, I.C., et al., *Extrafollicular antibody responses*. Immunol Rev, 2003. **194**: p. 8-18.
92. Manz, R.A., et al., *Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen*. Int Immunol, 1998. **10**(11): p. 1703-11.
93. Slifka, M.K., et al., *Humoral immunity due to long-lived plasma cells*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 363-72.
94. Zuniga, E., et al., *Trypanosoma cruzi infection selectively renders parasite-specific IgG+ B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide*. J Immunol, 2002. **168**(8): p. 3965-73.
95. Acosta Rodriguez, E.V., et al., *Interleukin-4 biases differentiation of B cells from Trypanosoma cruzi-infected mice and restrains their fratricide: role of Fas ligand down-regulation and MHC class II-transactivator up-regulation*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(1): p. 127-36.
96. Gourley, T.S. and C.H. Chang, *Cutting edge: the class II transactivator prevents activation-induced cell death by inhibiting Fas ligand gene expression*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 2917-21.
97. Acosta-Rodriguez, E.V., et al., *Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during Trypanosoma cruzi infection*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 493-502.

98. Merino, M.C., et al., *Peritoneum from Trypanosoma cruzi-infected mice is a homing site of Syndecan-1 neg plasma cells which mainly provide non-parasite-specific antibodies*. *Int Immunol*, 2010. **22**(5): p. 399-410.
99. Minoprio, P., et al., *Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent*. *J Immunol*, 1993. **151**(8): p. 4200-8.
100. O'Garra, A. and M. Howard, *Cytokines and Ly-1 (B1) B cells*. *Int Rev Immunol*, 1992. **8**(2-3): p. 219-34.
101. Roffe, E., et al., *IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of Trypanosoma cruzi infection*. *J Immunol*, 2012. **188**(2): p. 649-60.
102. Hovsepian, E., et al., *IL-10 inhibits the NF-kappaB and ERK/MAPK-mediated production of pro-inflammatory mediators by up-regulation of SOCS-3 in Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e79445.
103. Reed, S.G., et al., *IL-10 mediates susceptibility to Trypanosoma cruzi infection*. *J Immunol*, 1994. **153**(7): p. 3135-40.
104. Barbosa de Oliveira, L.C., et al., *Antigen-specific IL-4- and IL-10-secreting CD4+ lymphocytes increase in vivo susceptibility to Trypanosoma cruzi infection*. *Cell Immunol*, 1996. **170**(1): p. 41-53.
105. D'Avila, D.A., et al., *Immunological imbalance between IFN-gamma and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009. **104**(1): p. 100-5.
106. Vasconcelos, R.H., et al., *Interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha serum levels in chronic Chagas disease patients*. *Parasite Immunol*, 2015. **37**(7): p. 376-9.
107. Magalhaes, L.M., et al., *High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease*. *J Infect Dis*, 2013. **207**(4): p. 661-5.
108. Coelho dos Santos, J.S., et al., *Captopril increases the intensity of monocyte infection by Trypanosoma cruzi and induces human T helper type 17 cells*. *Clin Exp Immunol*, 2010. **162**(3): p. 528-36.
109. Morikawa, H. and S. Sakaguchi, *Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells*. *Immunol Rev*, 2014. **259**(1): p. 192-205.
110. Rudensky, A.Y., *Regulatory T cells and Foxp3*. *Immunol Rev*. **241**(1): p. 260-8.
111. Sojka, D.K., Y.H. Huang, and D.J. Fowell, *Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target*. *Immunology*, 2008. **124**(1): p. 13-22.
112. Caridade, M., L. Graca, and R.M. Ribeiro, *Mechanisms Underlying CD4+ Treg Immune Regulation in the Adult: From Experiments to Models*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 378.
113. Vasconcelos, J.F., et al., *Administration of granulocyte colony-stimulating factor induces immunomodulation, recruitment of T regulatory cells, reduction of myocarditis and decrease of parasite load in a mouse model of chronic Chagas disease cardiomyopathy*. *FASEB J*, 2013. **27**(12): p. 4691-702.
114. Flores-Garcia, Y., et al., *CD4+ CD25+ FOXP3+ Treg cells induced by rSSP4 derived from T. cruzi amastigotes increase parasitemia in an experimental Chagas disease model*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 632436.
115. Kotner, J. and R. Tarleton, *Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of Trypanosoma cruzi infection in mice*. *Infect Immun*, 2007. **75**(2): p. 861-9.
116. Sales, P.A., Jr., et al., *The regulatory CD4+CD25+ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect*, 2008. **10**(6): p. 680-8.
117. Mariano, F.S., et al., *The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection*. *Microbes Infect*, 2008. **10**(7): p. 825-33.
118. Bonney, K.M., et al., *Depletion of regulatory T cells decreases cardiac parasitosis and inflammation in experimental Chagas disease*. *Parasitol Res*, 2015. **114**(3): p. 1167-78.

119. Nihei, J., et al., *Administration of a nondepleting anti-CD25 monoclonal antibody reduces disease severity in mice infected with Trypanosoma cruzi*. Eur J Microbiol Immunol (8p), 2014. **4**(2): p. 128-37.
120. Vitelli-Avelar, D.M., et al., *Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes*. Scand J Immunol, 2005. **62**(3): p. 297-308.
121. Vitelli-Avelar, D.M., et al., *Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity?* Clin Exp Immunol, 2006. **145**(1): p. 81-92.
122. de Araujo, F.F., et al., *Characterization of the presence of Foxp3(+) T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease*. Hum Pathol. **42**(2): p. 299-301.
123. de Araujo, F.F., et al., *Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease*. PLoS Negl Trop Dis. **5**(5): p. e992.
124. de Araujo, F.F., et al., *Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity*. Immunobiology, 2012. **217**(8): p. 768-77.
125. Bonney, K.M. and D.M. Engman, *Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead*. Am J Pathol, 2015. **185**(6): p. 1537-47.
126. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
127. Goni, O., P. Alcaide, and M. Fresno, *Immunosuppression during acute Trypanosoma cruzi infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells*. Int Immunol, 2002. **14**(10): p. 1125-34.
128. Arocena, A.R., et al., *Myeloid-derived suppressor cells are key players in the resolution of inflammation during a model of acute infection*. Eur J Immunol, 2014. **44**(1): p. 184-94.
129. DosReis, G.A., *Evasion of immune responses by Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas disease*. Braz J Med Biol Res, 2011. **44**(2): p. 84-90.
130. Martins, G.A., et al., *CTLA-4 blockage increases resistance to infection with the intracellular protozoan Trypanosoma cruzi*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4893-901.
131. Poncini, C.V., et al., *Trypanosoma cruzi induces regulatory dendritic cells in vitro*. Infect Immun, 2008. **76**(6): p. 2633-41.
132. Poncini, C.V., et al., *Central role of extracellular signal-regulated kinase and Toll-like receptor 4 in IL-10 production in regulatory dendritic cells induced by Trypanosoma cruzi*. Mol Immunol, 2010. **47**(11-12): p. 1981-8.
133. Gutierrez, F.R., et al., *Regulation of Trypanosoma cruzi-induced myocarditis by programmed death cell receptor 1*. Infect Immun, 2011. **79**(5): p. 1873-81.
134. Dong, H., et al., *B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion*. Nat Med, 1999. **5**(12): p. 1365-9.
135. Latchman, Y., et al., *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 261-8.
136. Iwai, Y., et al., *PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver*. J Exp Med, 2003. **198**(1): p. 39-50.
137. Dulgerian, L.R., et al., *Programmed death ligand 2 regulates arginase induction and modifies Trypanosoma cruzi survival in macrophages during murine experimental infection*. Immunology, 2011. **133**(1): p. 29-40.
138. Ha, S.J., et al., *Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection*. J Exp Med, 2008. **205**(3): p. 543-55.
139. West, E.E., et al., *PD-L1 blockade synergizes with IL-2 therapy in reinvigorating exhausted T cells*. J Clin Invest, 2013. **123**(6): p. 2604-15.

140. Teixeira, A.R., et al., *Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease*. *J Clin Invest*, 1978. **62**(6): p. 1132-41.
141. Voltarelli, J.C., E.A. Donadi, and R.P. Falcao, *Immunosuppression in human acute Chagas disease*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1987. **81**(1): p. 169-70.
142. DosReis, G.A., M.E. Fonseca, and M.F. Lopes, *Programmed T-cell death in experimental chagas disease*. *Parasitol Today*, 1995. **11**(10): p. 391-4.
143. Graefe, S.E., et al., *CTLA-4 regulates the murine immune response to Trypanosoma cruzi infection*. *Parasite Immunol*, 2004. **26**(1): p. 19-28.
144. Lopes, M.F. and G.A. DosReis, *Trypanosoma cruzi-induced immunosuppression: selective triggering of CD4+ T-cell death by the T-cell receptor-CD3 pathway and not by the CD69 or Ly-6 activation pathway*. *Infect Immun*, 1996. **64**(5): p. 1559-64.
145. Minoprio, P., *Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches?* *Int J Parasitol*, 2001. **31**(5-6): p. 588-91.
146. Mizoguchi, A., et al., *Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation*. *Immunity*, 2002. **16**(2): p. 219-30.
147. Fillatreau, S., et al., *B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(10): p. 944-50.
148. Mauri, C., et al., *Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells*. *J Exp Med*, 2003. **197**(4): p. 489-501.
149. Yanaba, K., et al., *A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses*. *Immunity*, 2008. **28**(5): p. 639-50.
150. Matsushita, T., et al., *Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(10): p. 3420-30.
151. Yanaba, K., et al., *The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals*. *J Immunol*, 2009. **182**(12): p. 7459-72.
152. Yoshizaki, A., et al., *Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions*. *Nature*, 2012. **491**(7423): p. 264-8.
153. Maseda, D., et al., *Regulatory B10 cells differentiate into antibody-secreting cells after transient IL-10 production in vivo*. *J Immunol*, 2012. **188**(3): p. 1036-48.
154. Iwata, Y., et al., *Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells*. *Blood*, 2011. **117**(2): p. 530-41.
155. Blair, P.A., et al., *CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients*. *Immunity*, 2010. **32**(1): p. 129-40.
156. Wang, W.W., et al., *CD19+CD24hiCD38hiBregs involved in downregulate helper T cells and upregulate regulatory T cells in gastric cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(32): p. 33486-99.
157. Tian, J., et al., *Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice*. *J Immunol*, 2001. **167**(2): p. 1081-9.
158. Parekh, V.V., et al., *B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta I*. *J Immunol*, 2003. **170**(12): p. 5897-911.
159. Lee, J.H., et al., *Allergen-specific transforming growth factor-beta-producing CD19+CD5+ regulatory B-cell (Br3) responses in human late eczematous allergic reactions to cow's milk*. *J Interferon Cytokine Res*, 2011. **31**(5): p. 441-9.
160. Wang, R.X., et al., *Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease*. *Nat Med*, 2014. **20**(6): p. 633-41.

161. Ding, Q., et al., *Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice.* J Clin Invest, 2011. **121**(9): p. 3645-56.
162. Kaku, H., et al., *A novel mechanism of B cell-mediated immune suppression through CD73 expression and adenosine production.* J Immunol, 2014. **193**(12): p. 5904-13.
163. Mandapathil, M., et al., *Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells.* J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7176-86.
164. Mandapathil, M., et al., *Adenosine and prostaglandin E2 cooperate in the suppression of immune responses mediated by adaptive regulatory T cells.* J Biol Chem, 2010. **285**(36): p. 27571-80.
165. Hasko, G. and B.N. Cronstein, *Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity.* Trends Immunol, 2004. **25**(1): p. 33-9.
166. Saze, Z., et al., *Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells.* Blood, 2013. **122**(1): p. 9-18.
167. Khan, A.R., et al., *PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity.* Nat Commun, 2015. **6**: p. 5997.
168. Bodhankar, S., et al., *PD-1 Interaction with PD-L1 but not PD-L2 on B-cells Mediates Protective Effects of Estrogen against EAE.* J Clin Cell Immunol, 2013. **4**(3): p. 143.
169. Bodhankar, S., et al., *Estrogen-induced protection against experimental autoimmune encephalomyelitis is abrogated in the absence of B cells.* Eur J Immunol, 2011. **41**(4): p. 1165-75.
170. Zhang, J., et al., *IL-10 producing B cells partially restore E2-mediated protection against EAE in PD-L1 deficient mice.* J Neuroimmunol, 2015. **285**: p. 129-36.
171. Zhang, J., et al., *Treatment with IL-10 producing B cells in combination with E2 ameliorates EAE severity and decreases CNS inflammation in B cell-deficient mice.* Metab Brain Dis, 2015.
172. Shalapour, S., et al., *Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy.* Nature, 2015. **521**(7550): p. 94-8.
173. Kumar, S. and R.L. Tarleton, *The relative contribution of antibody production and CD8<sup>+</sup> T cell function to immune control of Trypanosoma cruzi.* Parasite Immunol, 1998. **20**(5): p. 207-16.
174. Kierszenbaum, F., *Protection of congenitally athymic mice against Trypanosoma cruzi infection by passive antibody transfer.* J Parasitol, 1980. **66**(4): p. 673-5.
175. Krettli, A.U., P. Weisz-Carrington, and R.S. Nussenzweig, *Membrane-bound antibodies to bloodstream Trypanosoma cruzi in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis.* Clin Exp Immunol, 1979. **37**(3): p. 416-23.
176. Lages-Silva, E., et al., *Effect of protective and non-protective antibodies in the phagocytosis rate of Trypanosoma cruzi blood forms by mouse peritoneal macrophages.* Parasite Immunol, 1987. **9**(1): p. 21-30.
177. Lima-Martins, M.V., et al., *Antibody-dependent cell cytotoxicity against Trypanosoma cruzi is only mediated by protective antibodies.* Parasite Immunol, 1985. **7**(4): p. 367-76.
178. Okabe, K., et al., *Cell-mediated cytotoxicity to Trypanosoma cruzi. I. Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity to trypomastigote bloodstream forms.* Clin Immunol Immunopathol, 1980. **16**(3): p. 344-53.
179. Bilate, A.M., et al., *TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy.* Microbes Infect, 2007. **9**(9): p. 1104-13.
180. Pereira, I.R., et al., *Tumor necrosis factor is a therapeutic target for immunological unbalance and cardiac abnormalities in chronic experimental Chagas' heart disease.* Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 798078.

181. DeJager, L. and C. Libert, *Tumor necrosis factor alpha mediates the lethal hepatotoxic effects of poly(I:C) in D-galactosamine-sensitized mice*. *Cytokine*, 2008. **42**(1): p. 55-61.
182. Lima, E.C., et al., *Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection in mice*. *Infect Immun*, 1997. **65**(2): p. 457-65.
183. Marchi, L.F., et al., *In vitro activation of mouse neutrophils by recombinant human interferon-gamma: increased phagocytosis and release of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines*. *Int Immunopharmacol*, 2014. **18**(2): p. 228-35.
184. Marsden, V., et al., *Herpes simplex virus type 2-infected dendritic cells produce TNF-alpha, which enhances CCR5 expression and stimulates HIV production from adjacent infected cells*. *J Immunol*, 2015. **194**(9): p. 4438-45.
185. Hu, Z., et al., *Functional heterogeneity in the CD4+ T cell response to murine gamma-herpesvirus 68*. *J Immunol*, 2015. **194**(6): p. 2746-56.
186. Marshall, H.D., et al., *Differential expression of Ly6C and T-bet distinguish effector and memory Th1 CD4(+) cell properties during viral infection*. *Immunity*, 2011. **35**(4): p. 633-46.
187. Murphy, K.M. and S.L. Reiner, *The lineage decisions of helper T cells*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(12): p. 933-44.
188. Gardner, D., L.E. Jeffery, and D.M. Sansom, *Understanding the CD28/CTLA-4 (CD152) pathway and its implications for costimulatory blockade*. *Am J Transplant*, 2014. **14**(9): p. 1985-91.
189. Hofmeyer, K.A., H. Jeon, and X. Zang, *The PD-1/PD-L1 (B7-H1) pathway in chronic infection-induced cytotoxic T lymphocyte exhaustion*. *J Biomed Biotechnol*, 2011. **2011**: p. 451694.
190. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. *J Exp Med*, 2000. **192**(7): p. 1027-34.
191. Carter, L., et al., *PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(3): p. 634-43.
192. Kretschmer, K., et al., *Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(12): p. 1219-27.
193. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. *J Exp Med*, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
194. Peng, Y., et al., *TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(13): p. 4572-7.
195. Larrubia, J.R., et al., *Costimulatory molecule programmed death-1 in the cytotoxic response during chronic hepatitis C*. *World J Gastroenterol*, 2009. **15**(41): p. 5129-40.
196. Zhang, Y., et al., *Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(31): p. 11695-700.
197. Racine, R., M. Chatterjee, and G.M. Winslow, *CD11c expression identifies a population of extrafollicular antigen-specific splenic plasmablasts responsible for CD4 T-independent antibody responses during intracellular bacterial infection*. *J Immunol*, 2008. **181**(2): p. 1375-85.
198. Kitamura, D., et al., *A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene*. *Nature*, 1991. **350**(6317): p. 423-6.
199. Leon, B., et al., *Unraveling effector functions of B cells during infection: the hidden world beyond antibody production*. *Infect Disord Drug Targets*, 2012. **12**(3): p. 213-21.
200. Shen, P. and S. Filatreau, *Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(7): p. 441-51.
201. Bao, Y. and X. Cao, *The immune potential and immunopathology of cytokine-producing B cell subsets: a comprehensive review*. *J Autoimmun*, 2014. **55**: p. 10-23.

202. Dang, V.D., et al., *From the regulatory functions of B cells to the identification of cytokine-producing plasma cell subsets*. *Curr Opin Immunol*, 2014. **28**: p. 77-83.
203. Mittrucker, H.W., et al., *Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against Salmonella typhimurium infection*. *J Immunol*, 2000. **164**(4): p. 1648-52.
204. Ugrinovic, S., et al., *Characterization and development of T-Cell immune responses in B-cell-deficient (Igh-6(-/-)) mice with Salmonella enterica serovar Typhimurium infection*. *Infect Immun*, 2003. **71**(12): p. 6808-19.
205. Barr, T.A., et al., *TLR and B cell receptor signals to B cells differentially program primary and memory Th1 responses to Salmonella enterica*. *J Immunol*, 2010. **185**(5): p. 2783-9.
206. Kang, H., J.S. Remington, and Y. Suzuki, *Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with Toxoplasma gondii despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase*. *J Immunol*, 2000. **164**(5): p. 2629-34.
207. Andoh, M., et al., *T cells are essential for bacterial clearance, and gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and B cells are crucial for disease development in Coxiella burnetii infection in mice*. *Infect Immun*, 2007. **75**(7): p. 3245-55.
208. Smelt, S.C., et al., *B cell-deficient mice are highly resistant to Leishmania donovani infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology*. *J Immunol*, 2000. **164**(7): p. 3681-8.
209. Mutnal, M.B., et al., *Infiltrating regulatory B cells control neuroinflammation following viral brain infection*. *J Immunol*, 2014. **193**(12): p. 6070-80.
210. Goenka, R., et al., *B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the intracellular bacterium Brucella abortus*. *J Infect Dis*, 2011. **203**(8): p. 1136-46.
211. Horikawa, M., et al., *Regulatory B cell (B10 Cell) expansion during Listeria infection governs innate and cellular immune responses in mice*. *J Immunol*, 2013. **190**(3): p. 1158-68.
212. Das, A., et al., *IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection*. *J Immunol*, 2012. **189**(8): p. 3925-35.
213. Brenner, C., et al., *Decoding cell death signals in liver inflammation*. *J Hepatol*, 2013. **59**(3): p. 583-94.
214. Ronco, M.T., et al., *Tumor necrosis factor alpha induced by Trypanosoma cruzi infection mediates inflammation and cell death in the liver of infected mice*. *Cytokine*, 2010. **49**(1): p. 64-72.
215. Perez, A.R., et al., *Short treatment with the tumour necrosis factor-alpha blocker infliximab diminishes chronic chagasic myocarditis in rats without evidence of Trypanosoma cruzi reactivation*. *Clin Exp Immunol*, 2009. **157**(2): p. 291-9.
216. Kroll-Palhares, K., et al., *TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during Trypanosoma cruzi infection: beneficial effects of TNF-alpha blockade*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2008. **103**(4): p. 375-85.
217. Truyens, C., et al., *The cachexia associated with Trypanosoma cruzi acute infection in mice is attenuated by anti-TNF-alpha, but not by anti-IL-6 or anti-IFN-gamma antibodies*. *Parasite Immunol*, 1995. **17**(11): p. 561-8.
218. Truyens, C., et al., *The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 1999. **67**(11): p. 5579-86.
219. Baeyens, A., et al., *Effector T cells boost regulatory T cell expansion by IL-2, TNF, OX40, and plasmacytoid dendritic cells depending on the immune context*. *J Immunol*, 2015. **194**(3): p. 999-1010.
220. Beug, S.T., et al., *Smac mimetics and innate immune stimuli synergize to promote tumor death*. *Nat Biotechnol*, 2014. **32**(2): p. 182-90.
221. Grinberg-Bleyer, Y., et al., *Cutting edge: NF-kappaB p65 and c-Rel control epidermal development and immune homeostasis in the skin*. *J Immunol*, 2015. **194**(6): p. 2472-6.

222. Deng, L., et al., *Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(2): p. 687-95.
223. Quezada, S.A., et al., *Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts*. *J Exp Med*, 2010. **207**(3): p. 637-50.
224. Kugler, D.G., et al., *CD4+ T cells are trigger and target of the glucocorticoid response that prevents lethal immunopathology in toxoplasma infection*. *J Exp Med*, 2013. **210**(10): p. 1919-27.
225. Yoo, J.K. and T.J. Braciale, *IL-21 promotes late activator APC-mediated T follicular helper cell differentiation in experimental pulmonary virus infection*. *PLoS One*, 2014. **9**(9): p. e105872.
226. Maltby, S., et al., *Production and differentiation of myeloid cells driven by proinflammatory cytokines in response to acute pneumovirus infection in mice*. *J Immunol*, 2014. **193**(8): p. 4072-82.
227. Weinlich, R., et al., *Protective roles for caspase-8 and cFLIP in adult homeostasis*. *Cell Rep*, 2013. **5**(2): p. 340-8.
228. DeBerge, M.P., K.H. Ely, and R.I. Enelow, *Soluble, but not transmembrane, TNF-alpha is required during influenza infection to limit the magnitude of immune responses and the extent of immunopathology*. *J Immunol*, 2014. **192**(12): p. 5839-51.
229. Boyman, O., et al., *Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes*. *Science*, 2006. **311**(5769): p. 1924-7.
230. Olkhanud, P.B., et al., *Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4(+) T cells to T-regulatory cells*. *Cancer Res*, 2011. **71**(10): p. 3505-15.
231. Saxena, A., et al., *Tc17 CD8+ T cells potentiate Th1-mediated autoimmune diabetes in a mouse model*. *J Immunol*, 2012. **189**(6): p. 3140-9.
232. Linterman, M.A., et al., *Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity*. *J Exp Med*, 2009. **206**(3): p. 561-76.
233. Notley, C.A., et al., *Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells*. *J Exp Med*, 2008. **205**(11): p. 2491-7.
234. Girones, N., et al., *Role of Trypanosoma cruzi autoreactive T cells in the generation of cardiac pathology*. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. **1107**: p. 434-44.
235. Shapiro-Shelef, M., et al., *Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells*. *Immunity*, 2003. **19**(4): p. 607-20.
236. Mahevas, M., et al., *Long-lived plasma cells in autoimmunity: lessons from B-cell depleting therapy*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 494.
237. Mahevas, M., et al., *B cell depletion in immune thrombocytopenia reveals splenic long-lived plasma cells*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(1): p. 432-42.
238. Demircik, F., T. Buch, and A. Waisman, *Efficient B cell depletion via diphtheria toxin in CD19-Cre/iDTR mice*. *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e60643.
239. da Costa, T.A., et al., *Immunomodulation by Trypanosoma cruzi: toward understanding the association of dendritic cells with infecting Tc1 and Tc11 populations*. *J Immunol Res*, 2014. **2014**: p. 962047.
240. Zhao, Y., et al., *Tolerogenic dendritic cells and rheumatoid arthritis: current status and perspectives*. *Rheumatol Int*, 2012. **32**(4): p. 837-44.
241. Tu, E., et al., *Pathogenic T cells persist after reversal of autoimmune disease by immunosuppression with regulatory T cells*. *Eur J Immunol*, 2013. **43**(5): p. 1286-96.
242. Liu, J., et al., *Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN-(gamma) and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway*. *Blood*, 2007. **110**(1): p. 296-304.

243. Cyster, J.G., *Homing of antibody secreting cells*. Immunol Rev, 2003. **194**: p. 48-60.
244. Calame, K.L., K.I. Lin, and C. Tunyaplin, *Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 205-30.
245. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
246. Bryan, M.A., S.E. Guyach, and K.A. Norris, *Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in Trypanosoma cruzi infection of susceptible and resistant mice*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(7): p. e733.
247. Piron, M., et al., *Development of a real-time PCR assay for Trypanosoma cruzi detection in blood samples*. Acta Trop, 2007. **103**(3): p. 195-200.





**8**

**PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**

---

### 8.1] Publicaciones

- *"The regulatory role of B cells in autoimmunity, infections and cancer: Perspectives beyond IL10 production."*

Gorosito-Serran M, Fiocca-Vernengo F, Beccaria CG, Acosta-Rodriguez EV, Montes C, Gruppi A. Review FEBS Letters 2015 (FI 3.169)

- *"Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors RORyt and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells."*

Bermejo DA, Jackson SW, Gorosito-Serran M, Acosta-Rodriguez EV, Amezcua-Vesely MC, Sather BD, Singh AK, Khim S, Mucci J, Liggitt D, Campetella O, Oukka M, Gruppi A, Rawlings DJ. Nature Immunology, 2013 (FI 25.6)

### 8.2] Distinciones

- Premio Leonardo Satz

*"Galectin-3 regulates germinal centers formation, autoreactive and long-lived antibody response"*.

Beccaria, C.G.; Amezcua Vesely, M.C.; Fiocca Vernengo, F.; Gorosito Serrán, M.; Ramello, M.C.; Tosello Boari, J.; Mucci, J.; Campetella, O.; Montes, C.L.; Acosta Rodriguez, E.V.; Gruppi, A. LXII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Mar del Plata, 19-22 Noviembre, 2014).

- Premio al Mejor Póster Área Inmunología

*"B CELLS REGULATE THE INFLAMMATORY CD4+ T CELL RESPONSE IN Trypanosoma cruzi INFECTION."*

M. Gorosito Serrán, J. Tosello Boari, M. C Ramello, C. Beccaria, F. Fiocca Vernengo, D. A Bermejo, M. C Amezcua Vesely, C. L Montes, E. V Acosta Rodriguez, A. Gruppi. X Congreso de Protozoología y enfermedades parasitarias organizado por la Sociedad Argentina de Protozoología (Mar Del Plata, 16-18 Noviembre, 2014)

- Premio Leonardo Satz

*"IL17RA regulates the magnitude of CD8+ T cell response to T. cruzi by modulating apoptosis, cell exhaustion and memory differentiation"*

Tosello Boari, J.; Fiocca Vernengo, F.; Ramello, M.C.; Amezcua Vesely, M.C.; Araujo Furlan, C.; Gorosito Serrán, M.; Montes, C.L.; Gruppi, A.; Acosta Rodriguez, E.V. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Los Cocos, Noviembre, 2013).

## 8.3] Becas

- **Beca de Formación de Posgrado tipo II de CONICET**

Directora: Adriana Gruppi. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. Abril de 2014 a Marzo de 2016.

- **Beca de Formación de Posgrado tipo I de CONICET**

Directora: Adriana Gruppi. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. Abril de 2011 a Marzo de 2013.

## 8.4] Presentaciones a congresos

### 8.4.1] De primera autoría

- Póster: *"PDL1-expressing B cells from mice infected with Trypanosoma cruzi suppress TNF production in vitro by a cell-contact mediated mechanism"*

Gorosito-Serrán, M.; Tosello-Boari, J.; Ramello, M.C.; Fiocca Vernengo, F.; Beccaria, C.G.; Montes C.; Acosta-Rodríguez, E.; Gruppi, A. LXIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Buenos Aires, Noviembre, 2015).

- Presentación Oral: *"B cells regulate the inflammatory CD4+ T cell response in Trypanosoma cruzi infection"*

Gorosito-Serrán, M.; Tosello-Boari, J.; Ramello, M.C.; Beccaria, C.G.; Fiocca Vernengo, F.; Bermejo, D.; Amezcua Vesely, M.C.; Montes C.; Acosta-Rodríguez, E.; Gruppi, A. LXII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Mar del Plata, Noviembre, 2014).

- Presentación Oral: *"B cell-deficient mice infected with Trypanosoma cruzi develop a pro-inflammatory T cell response potentially harmful for the host"*

Gorosito-Serrán, M.; Tosello-Boari, J., Bermejo, D.; Ramello, M.C.; Fiocca-Vernengo, F.; Amezcua Vesely, M.C.; Beccaria, C.G.; Montes C.; Acosta-Rodríguez, E.; Gruppi, A. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Los Cocos, Noviembre, 2013).

- Poster *"TNF-Blockade in B cell-deficient mice infected with Trypanosoma cruzi exacerbates a systemic inflammatory response and increases susceptibility to infection"*

Gorosito Serrán, M.; Bermejo, D.; Tosello Boari, J.; Ramello, M.C.; Amezcua Vesely, M.C.; Montes, C.L.; Acosta Rodríguez, E.V.; Gruppi, A. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Los Cocos, Noviembre, 2013).

- Poster: *"B cell-deficient mice infected with Trypanosoma cruzi develop a pro-inflammatory T cell response potentially harmful for the host"*

Gorosito-Serrán, M.; Tosello-Boari, J., Bermejo, D.; Ramello, M.C.; Fiocca-Vernengo, F.; Montes C.; Acosta-Rodríguez, E.; Gruppi, A. XXVII Annual Meeting, Chilean Society For Cell Biology. (Puerto Varas, Chile, Octubre de 2013)

- Poster: ***“La ausencia de linfocitos B en ratones infectados con Trypanosoma cruzi se asocia con cambios en la producción de citoquinas pro-inflamatorias que condicionarían la evolución de la infección”***

Gorosito Serrán, M.; Bermejo, D A; Tosello Boari, J; Ramello, C; Amezcua Vesely MC; Fiocca Vernengo, F; Montes, CL; Acosta Rodríguez, E V; Gruppi, A. LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Mar del Plata, Noviembre, 2012).

- Póster: ***“Respuesta de Poblaciones Linfocitarias B a la infección con Trypanosoma cruzi”***

Gorosito-Serrán, Melisa; Bermejo, Daniela A; Amezcua-Vesely, M Carolina; Acosta-Rodríguez, Eva V; Gruppi, Adriana. - LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (San Miguel de Tucumán, 19-21 Octubre de 2011)

#### 8.4.1] Trabajos en colaboración

- Póster y Presentación Oral en Workshop: ***“Galectin-3 restrains spontaneous germinal centers formation preventing autoimmunity”***

Beccaria, C. G.; Fiocca Vernengo, F.; Amezcua Vesely, M. C.; Ramello, M.C.; Tosello-Boari, J.; Gorosito-Serrán, M.; Piaggio, E.; Mucci, J.; Campetella, O.; Montes C.; Acosta-Rodríguez, E.; Gruppi, A.; Keystone Symposia Conference. T Follicular Helper Cells and Germinal Centers (B4). (Estados Unidos, Febrero, 2016).

- Presentación Oral: ***“Galectin-3 restrains spontaneous germinal centers formation preventing autoimmunity”***

Beccaria, C. G.; Fiocca Vernengo, F.; Amezcua Vesely, M. C.; Ramello, M.C.; Tosello-Boari, J.; Gorosito-Serrán, M.; Piaggio, E.; Mucci, J.; Campetella, O.; Montes C.; Acosta-Rodríguez, E.; Gruppi, A.; LXIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Buenos Aires, Noviembre, 2015).

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

Canale, F.; Ramello, M.C.; Araujo Furlan, C.; Gorosito-Serrán, M.; Tosello-Boari, J.; Gruppi, A.; Acosta-Rodríguez, E.; Montes C. LXIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Buenos Aires, Noviembre, 2015).

- Póster: ***“Chlamydia muridarum dampens the induction of protective Th1 immune responses by inducing IL10-producing B cells”***

Sánchez, L. R.; Godoy, G. J.; Gorosito Serrán, M.; Gruppi, A.; Motrich, R. D.; Rivero, LXIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Buenos Aires, Noviembre, 2015).

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

Fiocca Vernengo, F.; Beccaria, C. G.; Tosello-Boari, J.; Gorosito Serrán, M.; Araujo Furlan, C.; Acosta Rodríguez, E. V.; Montes, C. L.; Gruppi, A. , LXIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Buenos Aires, Noviembre, 2015).

- Presentación: ***"T cell-intrinsic IL-17RA-signaling modulates CD8+ T cell differentiation and exhaustion during Trypanosoma cruzi infection"***

Jimena Tosello, Cintia Araujo, Facundo Fiocca, María Ramello, María Amezcua, Melisa Gorosito, Nicolás Nuñez, Nicolas Cagnard, Eliane Piaggio, Carolina Montes, Adriana Gruppi, Eva Acosta. Nombre del evento: 4th European Congress of immunology Septiembre, 2015. Vienna.

- Presentación: ***"IL-17RA-signaling sustains immunity to Trypanosoma cruzi by modulating CD8+ T cell survival, differentiation and exhaustion"***

Jimena Tosello, Cintia Araujo, Facundo Fiocca, María Ramello, María Amezcua, Melisa Gorosito, Nicolás Nuñez, Nicolas Cagnard, Eliane Piaggio, Carolina Montes, Adriana Gruppi, Eva Acosta. Nombre del evento: Keystone Symposia: T Cells: Regulation and Effector Function (D3). Marzo, 2015, Estados Unidos.

- Presentación Oral: ***"PD-1+TIM-3+ T cells from 4T1 bearing mice display features of exhaustion and increased expression of immunomodulatory molecules"***

Canale, F.; Ramello, M.C.; Gorosito-Serrán, M.; Araujo Furlan, C.; Tosello-Boari, J.; Acosta-Rodríguez, E.; Gruppi, A.; Montes C. LXII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Mar del Plata, Noviembre, 2014).

- Póster: ***"Marginal zone B cell expresses higher levels of PD-L1 than follicular B cells"***

Fiocca Vernengo, F.; Beccaria, C. G.; Gorosito Serrán, M.; Acosta Rodriguez, E. V.; Montes, C. L.; Gruppi, A. LXII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Mar del Plata, Noviembre, 2014).

- Póster: ***"IL10 producing B lymphocytes in an experimental model of Chlamydia muridarum infection"***

Sánchez, L. R.; Godoy, G. J.; Gorosito Serrán, M.; Gruppi, A.; Motrich, R. D.; Rivero, V. E. LXII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Mar del Plata, Noviembre, 2014).

- Póster: ***"Interleukin-17 A and F sustain CD8+ T cell response to Trypanosoma cruzi by modulating survival, differentiation and exhaustion partially through CD8+ T cell-intrinsic IL17-RA signaling"***

Tosello-Boari, J.; Araujo Furlan, C.; Fiocca Vernengo, F.; Ramello, M.C.; Gorosito Serrán, M.; Montes, C. L.; Gruppi, A. Acosta Rodriguez, E. V. LXII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Mar del Plata, Noviembre, 2014).

- Premio Leonardo Satz ***"IL17RA regulates the magnitude of CD8+ T cell response to T. cruzi by modulating apoptosis, cell exhaustion and memory differentiation"***

Tosello Boari, J.; Fiocca Vernengo, F.; Ramello, M.C.; Amezcua Vesely, M.C.; Araujo Furlan, C.; Gorosito Serrán, M.; Montes, C.L.; Gruppi, A.; Acosta Rodriguez, E.V. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Los Cocos, Noviembre, 2013).

- Presentación Oral ***"Exhausted T cells (Tim3+PD1+) infiltrate tumors of 4T1 mammary carcinoma bearing mice"***

Canale, F.P.; Ramello, M.C.; Tosello Boari, J.; Araujo Furlan, C.; Gorosito Serrán, M.; Acosta Rodriguez, E.V.; Montes, C.L. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Los Cocos, Noviembre, 2013).

- Poster ***"B cells influence CD8+ T cell response in Trypanosoma cruzi infection"***

Fiocca Vernengo, F.; Gorosito Serrán, M.; Tosello Boari, J.; Beccaria, C.G.; Ramello, M.C.; Acosta Rodríguez, E.V.; Montes, C.L.; Gruppi, A. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Los Cocos, Noviembre, 2013).

- Poster ***"Galectin-3 regulates the formation of germinal centers, PD-L1 expression in B cells, and the generation of long-lived antibody-secreting cells"***

Beccaria, C.G.; Amezcua Vesely, M.C.; Fiocca Vernengo, F.; Gorosito Serrán, M.; Ramello, M.C.; Tosello Boari, J.; Montes, C.L.; Campetella, O.; Acosta Rodríguez, E.V.; Gruppi, A. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Los Cocos, Noviembre, 2013).

- Poster: ***"Papel de IL-17RA en el desarrollo de una respuesta citotóxica específica durante la infección Trypanosoma cruzi"***.

Tosello Boari, J; Ramello, MC; Gorosito Serrán, M; Fiocca Vernengo, F; Montes, CL; Gruppi, A; Acosta Rodríguez, EV. LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Mar del Plata, Noviembre, 2012).

- Poster: ***"Linfocitos T senescentes inducidos por tumores (LITSIT) promueven la secreción de factores involucrados en la angiogénesis por parte de Monocitos (Mo) humanos"***.

Ramello, M Cecilia; Tosello Boari, Jimena; Gorosito Serrán, Melisa; Acosta Rodríguez, Eva V; Montes, Carolina L. LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Mar del Plata, Noviembre, 2012).

- Presentación Oral: ***"Trypanosoma cruzi, via its transialidase, induces the production of IL-17 but not of IL-10, IFNg, nor IL-12 by B Lymphocytes through a RORgt/a independent mechanism"***.

Fiocca Vernengo F, Bermejo DA, Amezcua Vesely MC, Gorosito Serrán M, Montes CL, Mucci J, Campetella O, Acosta Rodríguez EV, Gruppi A. LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Mar del Plata, Noviembre, 2012).

- Presentación Oral: ***"B lymphocytes from infected mice with Trypanosoma cruzi produce IL-17 in response to the parasite active transialidase via CD45 and Btk-Tec"***.

Bermejo, Daniela A; Jackson, Shaun W; Amezcua-Vesely, M Carolina; Acosta-Rodríguez, Eva V; Gorosito-Serran, Melisa; Fiocca-Vernengo, Facundo; Sather Blythe D; Mucci, Juan; Campetella, Oscar; Oukka, Mohamed; Rawlings David J; Gruppi, Adriana. LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Mar del Plata, Noviembre, 2012).

- Poster: ***"Galectin-3 negative-regulates B lymphocyte differentiation to germinal center and antibody-secreting cells"***.

Amezcua Vesely MC, Fiocca Vernengo F, Gehrau RC, Gorosito Serrán M, Bermejo DA, Ramello MC, Tosello Boari J, Montes CL, Acosta Rodríguez EV, Campetella O, Gruppi A. LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. (Mar del Plata, Noviembre, 2012).