



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Caracterización de las células B productoras de IL-10 de  
sangre periférica en pacientes con enfermedad de Chagas  
crónica**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área Ciencias Biológicas

**Licenciada Magalí Celeste Girard**

Directora de tesis: Dra. Karina Andrea Gómez

Consejera de estudios: Dra. Rosanna Elizabeth Ramhorst

Lugar de trabajo: Laboratorio de Inmunología de las Infecciones por  
Tripanosomátidos, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología  
Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI-CONICET)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2021

## Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que con su colaboración a lo largo de estos años hicieron posible el desarrollo de esta Tesis.

Gracias al Estado Argentino que a través del CONICET y de la ANPCyT me brindó los medios para poder formarme y realizar investigación científica.

Al INGEBI, por otorgarme el espacio y las condiciones para llevar a cabo el proyecto.

A mi directora, Karina, por darme un lugar en el laboratorio y permitirme realizar esta Tesis. Por enseñarme que las mayores luchas siempre son contra los obstáculos internos y que la confianza en uno mismo es el mejor antídoto ante la adversidad.

A los médicos, Dres. Marisa Fernández, Yolanda Hernández y Raúl Chadi, por su compromiso con los pacientes y por ceder parte de su tiempo para la realización de este trabajo. Por el intercambio mutuo y el aprendizaje.

A los pacientes, por su confianza al momento de donar sangre para esta investigación. Sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

A Violeta Chiauzzi, por su gran ayuda con la extracción de sangre y a todos los donantes voluntarios que se brindaron para ayudarme en estos años.

A todos mis compañeros del LIIT e integrantes del laboratorio 222 durante estos años, por los momentos compartidos, las alegrías y el apoyo diario ante las adversidades del cotidiano científico. Sin duda hicieron del INGEBI un lugar más que agradable para trabajar.

A las amigas que me regaló el LIIT, Mica, Nadi, Pau y Fati, por ser el apoyo que todos necesitamos cuando se apaga la luz y el abrazo que queremos cuando el corazón salta de alegría. A los vecinos de mesada y amigos Arturo y Susi, por ser tan lindas personas y regalarme su amistad.

A mi familia, por apoyarme incondicionalmente durante estos años y desde siempre. En especial a mi papá y a mi mamá por ser las raíces que me sostienen y a las cuales siempre puedo acudir. Por darme la libertad para ser la mejor versión de mi misma. A Dorita, por su cariño y por apoyarme siempre.

A Juan, por el amor de todos los días, por sostenerme aún cuando resultaba doloroso. Por darme paz y felicidad infinitas.

A la familia de Juan, que ya es mi familia, por el cariño que me brindan siempre.

A mis amigas, Magui, Flor y Juli, por acompañarme y darme fuerzas a la distancia estos últimos meses y brindarme su hermosa amistad desde hace tantos años.

A mis amigos de la facu, por estar presentes y acompañarme también en esta etapa.

A mis bebés felinos, Roquito y Chaio por el amor que me dan todos los días.

## Caracterización de las células B productoras de IL-10 de sangre periférica en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

**Resumen.** El curso clínico de la enfermedad de Chagas crónica (EChC) depende tanto de la respuesta inmune generada por el huésped como de la capacidad de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) para evadirla. El desarrollo de una potente respuesta inflamatoria es necesario para la eliminación del parásito, pero a su vez contribuye al daño tisular. Así, los mecanismos reguladores de la inmunidad constituyen elementos claves para contener esta respuesta exacerbada y su estudio es fundamental para entender los factores involucrados en la inmunopatología. La función regulatoria de las células B (Bregs), a través de la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, principalmente IL-10 (B10), ha sido de interés en el estudio de enfermedades infecciosas y autoinmunes en humano, siendo las poblaciones CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> (transicionales) y CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> (memoria), las más enriquecidas en IL-10 en sangre periférica. En el contexto de la EChC, se sabe que *T. cruzi* modifica la distribución fenotípica de las células B de sangre periférica, sin embargo, la población de células B10 continúa siendo poco estudiada. En la presente Tesis se evaluó la frecuencia y la distribución fenotípica, en base a los marcadores CD24, CD27 y CD38, de las células B y en particular de las células B10 de sangre periférica en pacientes con distintas formas clínicas de la EChC, en condiciones *ex vivo* y frente al estímulo *in vitro*. Asimismo, se estudió la expresión de la molécula regulatoria PD-L1 en las células B estimuladas *in vitro*. Para ello, las células mononucleares de sangre periférica (CMN) de pacientes con EChC (con o sin cardiopatía) e individuos no infectados (NI-controles) se incubaron con PMA+Ionomicina junto con Brefeldina A (PIB) durante 5 hs (condición *ex vivo*) ó las células B aisladas se estimularon con lisado de *T. cruzi*, CpG+CD40L o CpG+CD40L+*T. cruzi* durante 48 hs y las últimas 5 hs junto con PIB, y se marcaron para su análisis por citometría de flujo. Los resultados *ex vivo* mostraron que los pacientes con cardiopatía presentaron una expansión de las células B transicionales, así como una distribución fenotípica diferencial de las células B10, en particular un incremento de las células B10 vírgenes y B10 CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>. La frecuencia de células B10 totales y la expresión de IL-10 en las mismas fueron similares entre los grupos, evidenciando que estas células en los pacientes infectados con *T. cruzi* mantienen la capacidad para producir IL-10. Adicionalmente, la distribución fenotípica de las células B10 *ex vivo* fue similar en pacientes sin alteraciones cardíacas e individuos NI. *In vitro*, el estímulo con *T. cruzi* indujo una disminución de las células B transicionales en los pacientes con EChC, así como un aumento de las células B10 y de la secreción de IL-10 en todos los grupos, siendo menos pronunciado en los pacientes con compromiso cardíaco. La distribución

fenotípica de las células B10 mostró una disminución de las B10 transicionales en los pacientes sin cardiopatía y un aumento de las B10 CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> y CD27<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> en los pacientes con la forma cardíaca. Estos resultados sugieren que la estimulación con *T. cruzi* induce un aumento de tipo innato de células B10, que en los pacientes con cardiopatía estaría asociado con el incremento de poblaciones B10 CD27<sup>-</sup>, mientras que en los pacientes sin alteraciones y en los NI, estaría dado por poblaciones fenotípicas diferentes a las analizadas en este trabajo. A su vez, las células B de los pacientes con cardiopatía evidenciaron una menor diferenciación a células B10 frente al estímulo con CpG+CD40L. Por otra parte, los pacientes con EChC mostraron un aumento de células B PD-L1<sup>+</sup> frente al estímulo con *T. cruzi* y una menor expresión de esta molécula reguladora en las células estimuladas de forma inespecífica. Estos hallazgos muestran una relación entre las alteraciones fenotípicas en las células B10 y las distintas formas clínicas de la EChC, sugiriendo la potencial contribución de estas células en el curso clínico de la infección crónica con *T. cruzi*.

**Palabras clave:** Enfermedad de Chagas crónica, infección por *Trypanosoma cruzi*, células B regulatorias, interleuquina-10, regulación de la respuesta inmune, células B transicionales.



---

## Characterization of peripheral blood IL-10-producing B cells from patients with chronic Chagas disease.

**Abstract.** The clinical course of chronic Chagas disease (CChD) depends both on the immune response developed by the host and on the ability of *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) to evade it. The development of a potent inflammatory response is essential to parasite removal but also contributes to tissue damage. Thus, immunity regulation mechanisms are key elements to contain this uncontrolled response and its study is necessary to understand the factors involved in immunopathology of CChD. Regulatory function of B cells (Bregs), through anti-inflammatory cytokine secretion, mainly IL-10 (B10), has been of interest in the study of infectious and autoimmune human diseases, being CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> (transitional) and CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> (memory) populations, the most enriched in IL-10 in peripheral blood. In the context of CChD, *T. cruzi* modifies phenotypic distribution of peripheral blood B cells, although B10 cell compartment has not been studied yet. In this Thesis, the frequency and phenotypic distribution based on CD24, CD27 and CD38 expression of peripheral blood B and B10 cells were evaluated in patients with different clinical forms of CChD, in an *ex vivo* approach and with *in vitro* stimulation. Furthermore, the expression of the regulatory molecule PD-L1 was assessed in *in vitro* stimulated B cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with CChD (with or without cardiac involvement) and non-infected individuals (NI- controls) were incubated with PMA+Ionomycin with Brefeldin A (PIB) during 5 hs (*ex vivo* condition) or isolated B cells were stimulated with *T. cruzi* lysate, CpG+CD40L or CpG+CD40L+*T. cruzi* during 48 hs and the last 5 hs with PIB, and they were analyzed by flow cytometry. *Ex vivo* results showed that patients with the cardiac form of CChD have an expansion of transitional B cell compartment and an altered phenotypic distribution of B10 cells, in particular an increase of naïve and CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> B10 cells. Frequency of total B10 cells and IL-10 expression within these cells were similar among groups, showing that these populations in patients infected with *T. cruzi* maintain the ability to produce IL-10. In addition, the phenotypic distribution of B10 cells *ex vivo* follows the same pattern in patients without cardiac involvement and NI individuals. *In vitro* stimulation with *T. cruzi* induced a reduction of transitional B cells in CChD patients and an increase of B10 cells and IL-10 secretion in CChD patients and NI individuals, being less pronounced in patients with the cardiac form. The phenotypic distribution of B10 cells showed a diminished proportion of transitional B10 cells in patients without cardiac involvement and an increase in CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> and CD27<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> B10 cells in patients with cardiac disease. These results suggest that *T. cruzi* stimulation induce an

innate-like B10 cell increase that in patients with the cardiac form would be associated with CD27<sup>-</sup> B10 cell subsets, while in patients without cardiac involvement and NI individuals, would be related with phenotypic populations different from those analyzed in this Thesis. Furthermore, B cells stimulated with CpG+CD40L displayed less differentiation to B10 cells in patients with the cardiac form. Finally, patients with CChD displayed an increase in PD-L1<sup>+</sup> B cells in *T. cruzi* stimulated samples and a lower expression of this regulatory molecule in non-specifically stimulated B cells. The association found between phenotypic alterations of B10 cells and the different clinical forms of CChD suggests a potential contribution of these cells in the clinical outcome of chronic infection with *T. cruzi*.

**Keywords:** Chronic Chagas disease, *Trypanosoma cruzi* infection, regulatory B cells, interleukin 10, immune response regulation, transitional B cells.

Parte de los resultados presentados en este trabajo de Tesis Doctoral forman parte de la siguiente publicación científica:

Girard, M.C., Acevedo, G.R., Ossowski, M.S., Fernández M., Hernández Y., Chadi R., Gómez K.A. Ex vivo characterization of Breg cells in patients with chronic Chagas disease. *Sci Rep* 11, 5511 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84765-x>.

La segunda parte de los resultados se encuentra al momento en preparación para ser enviada a revisión a la revista *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, como parte de una edición especial titulada: *Novel Insights Into the Immune Mechanisms Associated With the Pathogenesis of Chagas Disease*.

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>AHB</b>	Infección aguda con el virus de la Hepatitis B	<b>FO</b>	Linfocitos B foliculares
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico	<b>GIPLs</b>	Glicoinositolfosfolípidos
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato	<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>B10</b>	Células B productoras de IL-10	<b>HAI</b>	Ensayo de hemaglutinación indirecta
<b>B17</b>	Células B productoras de IL-17	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Agua oxigenada
<b>BFA</b>	Brefeldina A	<b>IAC</b>	Control interno de amplificación
<b>BTr</b>	Linfocitos B transicionales	<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia indirecta
<b>Breg</b>	Células B regulatorias	<b>IFM</b>	Intensidad de fluorescencia media
<b>BZM</b>	Linfocitos B de la zona marginal del bazo	<b>Igs</b>	Inmunoglobulinas
<b>CCC</b>	Cardiopatía chagásica crónica	<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>CDF</b>	Células dendríticas foliculares	<b>MAC</b>	Complejo de ataque a la membrana
<b>CDI</b>	Cardiopatía dilatada idiopática	<b>MASPs</b>	Proteínas de superficie asociadas a mucinas
<b>CD40L</b>	Ligando de CD40	<b>MO</b>	Médula ósea
<b>CG</b>	Centro germinal	<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>CHB</b>	Infección crónica con el virus de la Hepatitis B	<b>NOS</b>	Especies reactivas del nitrógeno
<b>CMH</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad	<b>OLS</b>	Órganos linfáticos secundarios
<b>CMN</b>	Células mononucleares de sangre periférica	<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>Cox</b>	Ciclooxigenasa	<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígenos	<b>pb</b>	Pares de bases
<b>CpG</b>	Oligonucleótido CpG (agonista humano del receptor TLR9)	<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>CVID</b>	Inmunodeficiencia variable común	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>DAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a daño	<b>PMA</b>	Forbol-12-miristato-13-acetato, Ionomicina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido	<b>PIB</b>	Forbol-12-miristato-13-acetato, Ionomicina, Brefeldina A
<b>DO</b>	Densidad óptica	<b>Poli I:C</b>	Ácido policitídílico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol	<b>Prxs</b>	Enzimas peroxidasas
<b>EAE</b>	Encefalomiелitis autoinmune experimental	<b>PWB</b>	Solución de permeabilización/lavado
<b>ECG</b>	Electrocardiograma	<b>qPCR</b>	PCR en tiempo real
<b>EChC</b>	Enfermedad de Chagas crónica	<b>RNA-seq</b>	Técnica de secuenciación masiva del ARN
<b>EDTA</b>	Ácido tetra-acético de etilendiamina		

---

<b>RM50</b>	Reactividad máxima 50.	<b>TI</b>	Timo independiente
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno	<b>Tfh</b>	Células T colaboradoras foliculares
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto	<b>Th</b>	Células T colaboradoras
<b>RRP</b>	Receptores de reconocimiento de patrones	<b>TLRs</b>	Receptores de tipo Toll
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino	<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>SNA</b>	Sistema nervioso autónomo	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alpha
<b>SNE</b>	Sistema nervioso entérico	<b>Treg</b>	Células T regulatorias
<b>SODs</b>	Superóxido dismutasas	<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil)-aminometano
<b>TAE</b>	Tampón Tris-acetato EDTA	<b>TSs</b>	Transialidasas
<b><i>T. cruzi</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<b>U</b>	Unidades
<b>TcGDH</b>	Glutamato deshidrogenasa de <i>T. cruzi</i>	<b>UDT</b>	Unidades discretas de tipificación
<b>TCR</b>	Receptor del linfocito T	<b>VHB</b>	Virus de la Hepatitis B
<b>TcTox</b>	Hemolisina de <i>T. cruzi</i>	<b>VHC</b>	Virus de la Hepatitis C
<b>TD</b>	Timo dependiente	<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$		

---

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. La Enfermedad de Chagas.....	2
1.1.1. Historia y generalidades.....	2
1.1.2. Epidemiología, distribución geográfica y vías de transmisión.....	2
1.1.3. Fases, diagnóstico y manifestaciones clínicas.....	4
1.1.4. Ciclo de vida e infección de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	7
1.1.5. Patogénesis.....	9
1.2. Respuesta inmune en la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	10
1.2.1. Generalidades.....	10
1.2.2. Respuesta inmune innata.....	12
1.2.3. La respuesta inmune innata en la infección con <i>T. cruzi</i> .....	13
1.2.4. Respuesta inmune adaptativa: Linfocitos T.....	16
1.2.5. Respuesta de linfocitos T en la infección con <i>T. cruzi</i> .....	19
1.2.6. Respuesta inmune adaptativa: Linfocitos B.....	23
1.2.6.1 Generalidades.....	23
1.2.6.2. Clasificación de acuerdo a su ontogenia y localización.....	23
1.2.6.3. Desarrollo de los linfocitos B.....	26
1.2.6.4. Linfocitos B transicionales.....	28
1.2.6.5. Activación, diferenciación e inmunidad mediada por linfocitos B.....	29
1.2.7. Inmunidad mediada por los linfocitos B en la infección con <i>T. cruzi</i> .....	32
1.3. Regulación de la respuesta inmune por los linfocitos B.....	40
1.3.1. Definición de los linfocitos B regulatorios.....	40
1.3.2. Factores de inducción involucrados en el desarrollo y la función de los linfocitos Breg.....	41
1.3.3. Identificación fenotípica y desarrollo de los linfocitos Breg.....	43
1.3.4. Funcionalidad de los linfocitos Breg: mecanismos de supresión.....	45
1.3.5. Rol de los linfocitos Breg en enfermedades infecciosas.....	47

---

Hipótesis y objetivos.....	53
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
2.1. Soluciones, medios de cultivo y reactivos generales.....	55
2.2. Reclutamiento de pacientes y toma de muestras.....	56
2.3. Lisado de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	58
2.3.1. Lisado de epimastigote.....	58
2.3.2. Lisado de tripomastigote.....	58
2.4. Caracterización de las muestras de los pacientes.....	59
2.4.1. Determinación de IgG total contra <i>T. cruzi</i> .....	59
2.4.2. Detección y cuantificación de <i>T. cruzi</i> en las muestras de sangre.....	59
2.4.2.1. Extracción de ADN total de <i>T. cruzi</i> .....	59
2.4.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).....	60
2.5. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.....	61
2.6. Estudio <i>ex vivo</i> .....	61
2.6.1. Cultivo y estimulación de células mononucleares de sangre periférica.....	61
2.7. Estudio <i>in vitro</i> .....	64
2.7.1. Aislamiento de células B.....	64
2.7.2. Cultivo y estimulación de células B aisladas.....	65
2.8. Citometría de Flujo.....	66
2.8.1. Anticuerpos y equipamiento.....	66
2.8.2. Marcación de moléculas de superficie.....	66
2.8.3. Marcación intracitoplasmática.....	67
2.8.4. Análisis de citometría de flujo.....	67
2.9. Cuantificación de citoquinas en sobrenadante.....	69
2.10. Análisis estadístico.....	70
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>

---

3.1. Caracterización <i>ex vivo</i> de las células B y B10 presentes en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica.....	73
3.2. Caracterización <i>in vitro</i> de las células B y B10 a partir de células B aisladas de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica frente al estímulo con <i>T. cruzi</i> y frente al estímulo inespecífico con CpG+CD40L.....	84
3.3. Caracterización de la expresión de PD-L1+ en las células B de los pacientes con Enfermedad de Chagas crónica frente al estímulo <i>in vitro</i> con <i>T. cruzi</i> y con CpG+CD40L.....	95
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
4.1 Caracterización <i>ex vivo</i> de las células B y B10 en base a la expresión de los marcadores CD24, CD27 y CD38 presentes en CMN de pacientes con las distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas crónica.....	101
4.2 Caracterización de las células B y B10 en base a la expresión de los marcadores CD24, CD27 y CD38 en células B aisladas de pacientes con las distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas crónica frente al estímulo <i>in vitro</i> .....	109
4.3. Estudio de la expresión de la molécula regulatoria PD-L1 en las células B estimuladas <i>in vitro</i> de los pacientes con distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas crónica.....	118
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>121</b>
PERSPECTIVAS.....	124
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>126</b>
<b>7. APÉNDICE.....</b>	<b>149</b>



# 1. INTRODUCCIÓN

---



*“Hay una manera de contribuir a la protección de la humanidad, y es no resignarse. No mirar con indiferencia cómo desaparece de nuestra mirada la infinita riqueza que forma el universo que nos rodea, con sus colores, sonidos y perfumes.” Ernesto Sábato.*

## **1.1. La Enfermedad de Chagas.**

### **1.1.1. Historia y generalidades.**

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, considerada actualmente como una de las 20 enfermedades tropicales desatendidas (en inglés *Neglected tropical diseases*), por la Organización Mundial de la Salud (OMS), es una antropozoonosis causada por la infección con el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Fue descrita por primera vez por el médico e investigador brasileño Carlos Chagas en el año 1909, en un estudio considerado como uno de los más completos en la historia de la medicina tropical por incluir la descripción de todos los elementos de la epidemiología de la enfermedad: el agente causante, los ciclos de transmisión, incluyendo los vectores, reservorios y huéspedes involucrados, así como la patogénesis en el humano (Chagas, 1909). Años más tarde, el Dr. Salvador Maza confirmó la existencia de casos autóctonos en Argentina y diagnosticó el primer caso agudo en el país en 1927 (OMS, 2015).

Esta enfermedad constituye un grave problema de salud pública en el continente americano, debido a las manifestaciones clínicas de un alto porcentaje de las personas que la padecen, por las consecuencias sociales y laborales para los afectados, y por el alto costo que representa para los servicios de salud el manejo de las consecuencias en la salud de los pacientes. Según la OMS, y de forma similar a otras enfermedades desatendidas “La enfermedad de Chagas es un indicador de pobreza y desventaja, afecta poblaciones con baja visibilidad y voz política, causa estigma y discriminación, es relativamente desatendida por investigadores y tiene un impacto considerable en la morbilidad y mortalidad” (OMS, 2010). En este sentido, si bien es una enfermedad de naturaleza infecciosa, está fuertemente ligada a factores socioeconómicos y ambientales, lo que la convierten en una problemática multidimensional, cuyas consecuencias interrelacionadas justifican la necesidad de buscar soluciones multisectoriales.

### **1.1.2. Epidemiología, distribución geográfica y vías de transmisión.**

La enfermedad de Chagas es endémica en 21 países de América Latina, distribuyéndose desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina y Chile, donde la transmisión vectorial, a través de las heces o la orina de insectos triatomíneos es la vía principal de contagio (Pérez-Molina y Molina, 2018). A nivel mundial, según datos de la OMS se estima que hay entre 6 - 7 millones de personas infectadas, más de 100

millones en riesgo de adquirir la enfermedad, 56.000 nuevos casos por año y 12.000 fallecimientos anuales (Coura y Viñas, 2010, OMS, 2020).

Si bien tradicionalmente se la confinó a zonas pobres o rurales de América Central y América del Sur, los patrones migratorios mundiales y la incidencia de otras vías de transmisión no vectoriales condujeron a que la enfermedad de Chagas expanda sus fronteras geográficas naturales, convirtiéndola en una problemática de salud mundial (Schmunis y Yadon, 2010).

*T. cruzi* es una especie heterogénea con alta variabilidad genética y fenotípica, que ha sido clasificada en seis clados (TcI a TcVI), denominados unidades discretas de tipificación (UDT). La diversidad genética hallada entre estas UDT está estrechamente relacionada con la distribución geográfica, la patogénesis, las características clínicas de la infección desarrollada y la respuesta a la terapia en los pacientes (Zingales *et al.*, 2012). *T. cruzi* es transmitido en las áreas endémicas a través de varias especies pertenecientes a tres géneros de insectos triatomíneos hematófagos: *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius*. Estos vectores están ampliamente distribuidos en América Latina, desde Méjico hasta Argentina y Chile, habitando tanto áreas boscosas como secas (OMS, 2002). Además de la vía vectorial, existen otras formas de transmisión de *T. cruzi* que han ganado mayor atención en las últimas décadas en aquellos países endémicos y son de considerable importancia en los países no endémicos. Estas formas incluyen: la transmisión vertical congénita desde madres infectadas hacia los hijos, el contagio por transfusión de sangre o por transplante de órganos provenientes de personas infectadas, y en menor medida, la ingesta de comida o bebida contaminada con el parásito y los accidentes de laboratorio (Rassi Jr *et al.*, 2010). El contagio por ingesta de comida o bebida contaminada, denominado Chagas oral, si bien es poco usual, es responsable de brotes regionales de infección aguda en áreas desprovistas de insectos vectores domiciliados, principalmente en Venezuela y Brasil (Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012, Noya *et al.*, 2017, Santana *et al.*, 2019). Estos brotes están normalmente asociados a infecciones masivas que resultan en una manifestación clínica aguda más severa de la enfermedad y una alta mortalidad (Pereira *et al.*, 2009).

Dado que no existe hasta la actualidad una vacuna contra la enfermedad de Chagas, el control vectorial, así como la detección temprana de la enfermedad y el consecuente tratamiento con drogas antiparasitarias, han sido los métodos más efectivos para prevenir sus consecuencias en América Latina.

### 1.1.3. Fases, diagnóstico y manifestaciones clínicas.

El curso clínico de la enfermedad de Chagas comprende una fase aguda y una fase crónica. La fase aguda inicia cuando ocurre la infección con *T. cruzi* por cualquiera de las vías mencionadas previamente, y en la mayoría de los casos es asintomática. Sin embargo, algunos pacientes pueden presentar síntomas leves e inespecíficos como fiebre, inflamación en el sitio de inoculación, dolor de cabeza, dolores musculares, agrandamiento de ganglios linfáticos, entre otros. En algunos casos, se produce un nódulo subcutáneo en el sitio de inoculación que se observa como una lesión cutánea con forma de roncha o pápula, denominado chagoma. Cuando la inoculación ocurre en la conjuntiva ocular (2% de los casos agudos sintomáticos) se observa una inflamación característica en el párpado (edema palpebral con adenitis retro auricular) que se denomina signo de Romaña (Bern, 2015). Esta fase se caracteriza por la presencia de una alta parasitemia y presenta una duración de entre uno y dos meses, luego de los cuales se resuelve espontáneamente. Es por esto que en la mayoría de los casos las personas infectadas no son diagnosticadas durante esta primera fase. En caso de sospecha y debido a la parasitemia elevada durante esta fase, el diagnóstico radica en las técnicas parasitológicas directas que incluyen microscopía directa, hemocultivo o xenocultivo y el método de concentración de Strout (en caso de que la parasitemia no sea tan elevada) o microhematocrito en recién nacidos (Murcia *et al.*, 2013). En los últimos años, la detección de ADN del parásito mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en una alternativa atractiva para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas durante esta fase, principalmente por superar la baja sensibilidad de los ensayos parasitológicos directos (Schijman *et al.*, 2011).

Si la persona no es tratada con las drogas antiparasitarias disponibles, permanece infectada, la parasitemia desciende paulatinamente y se instaura lo que se conoce como fase crónica de la enfermedad de Chagas (Prata, 2001, Coura y Borges-Pereira, 2010). En esta fase, la parasitemia persiste, pero es más difícil de detectar por medios directos, y debido a la elevada producción de anticuerpos específicos de tipo IgG, su detección se convierte en el principal método de diagnóstico (**Figura 1.1.1**). Los métodos serológicos más comúnmente utilizados son el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la hemoaglutinación indirecta (HAI) (Andrade *et al.*, 2011). Debido a la ausencia de un ensayo “*gold standard*”, la OMS recomienda el uso en paralelo de dos de estas pruebas serológicas (una de ellas ELISA) para el diagnóstico, las cuales deben dar ambas positivas para determinar en forma fehaciente la infección por *T. cruzi* (OMS, 2002). En caso de resultados discordantes, se realiza la tercera prueba cuyo

resultado arrojará el diagnóstico final con aproximadamente un 98% de certeza (OMS, 2002). Asimismo, el diagnóstico molecular es útil para determinados escenarios que incluyen: la detección temprana por la transmisión congénita en recién nacidos, cuando hay presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* de la madre, el seguimiento por reactivación del parásito en pacientes inmunodeprimidos o pacientes con miocardiopatía chagásica avanzada que han recibido un trasplante de corazón o pacientes que han recibido un órgano de un donante *T. cruzi* positivo y en algunos casos, en la evaluación de nuevos tratamientos en ensayos clínicos (Alonso-Padilla *et al.*, 2017).

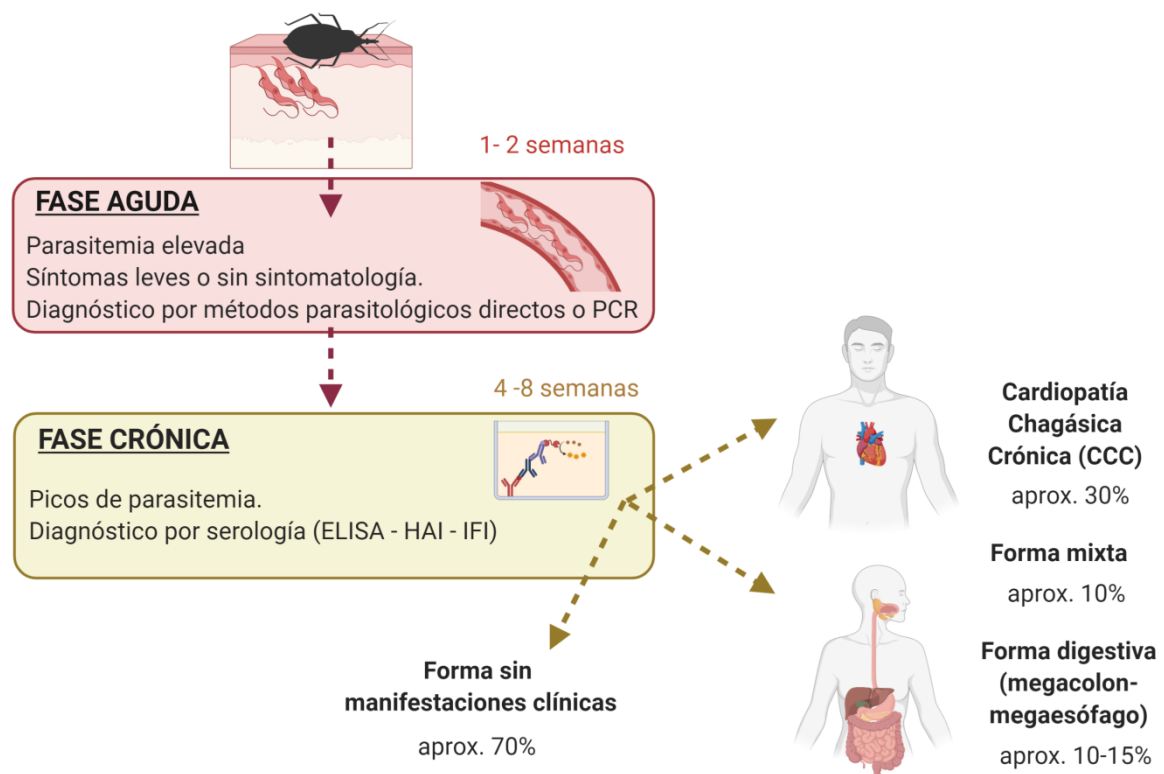
En la fase crónica o enfermedad de Chagas crónica (EChC) pueden presentarse cuatro formas o manifestaciones clínicas diferentes: la forma sin manifestaciones clínicas, también llamada indeterminada o asintomática, que ocurre en el 70% de las personas infectadas, la forma cardíaca, la forma digestiva o la forma mixta (cardíaco-digestiva) (Coura y Borges-Pereira, 2010). Las últimas tres se caracterizan por la presencia de signos y síntomas específicos, y ocurren en el 30 al 40% de los infectados, generalmente luego de 15 a 20 años de la infección primaria (Dias, 1989, Ribeiro y da Costa Rocha, 1998, Pérez-Molina y Molina, 2018). En la forma sin manifestaciones clínicas, los pacientes presentan serología positiva, pero ausencia de signos clínicos y síntomas de daño cardíaco y/o digestivo, así como radiografía de tórax y electrocardiograma (ECG) normales (Bocchi *et al.*, 2017, Pérez-Molina y Molina, 2018).

La forma cardíaca o cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) es la manifestación clínica más frecuente y severa, ocurre en el 15-45% de los pacientes en la fase crónica y afecta mayormente el sistema de conducción y el miocardio (Ribeiro *et al.*, 2012). Constituye esencialmente una cardiomiopatía dilatada, en la cual el estado de inflamación crónico, usualmente de baja intensidad, pero constante, conduce al daño progresivo y al desarrollo de fibrosis en el tejido cardíaco (Andrade *et al.*, 2014). La CCC se manifiesta mediante tres síndromes que pueden coexistir en el mismo paciente: arritmia, tromboembolia e insuficiencia cardíaca (Marin-Neto *et al.*, 2007). Las manifestaciones tempranas de la CCC son leves, frecuentemente asociadas a alteraciones asintomáticas detectadas en el electrocardiograma o en estudios complementarios, como ecocardiografía, holter cardíaco o resonancia magnética (Marin-Neto *et al.*, 2007). Subsecuentemente, se pueden observar anormalidades en la conducción, más frecuentemente la combinación de bloqueo completo de rama derecha y bloqueo fascicular anterior izquierdo, y contracciones ventriculares prematuras (Viotti *et al.*, 2005). En la etapa más avanzada de la CCC, se detecta dilatación del ventrículo

izquierdo y deterioro de la función sistólica, ambas manifestaciones comunes a todas las cardiomiopatías dilatadas (Ribeiro *et al.*, 2012).

La forma digestiva ocurre en el 10 al 20% de los casos, se caracteriza por el agrandamiento del esófago y/o el colon y se manifiesta mayoritariamente en la población distribuida al sur de la cuenca del Amazonas (Prata, 2001, OMS, 2002). Las manifestaciones involucran desde trastornos de la motilidad del tubo digestivo asintomáticos o acalasia leve hasta megaesófago y/o megacolon severos. A nivel histopatológico, la característica más frecuente observada en estos pacientes es la invasión de células inflamatorias de los plexos entéricos y la pérdida de neuronas en el sistema nervioso entérico (SNE). Si bien las manifestaciones clínicas más comunes son el desarrollo de megaesófago y/o megacolon, las condiciones patológicas causadas por anomalías del SNE pueden llegar a cualquier segmento del tubo digestivo, incluido el estómago, diferentes secciones del intestino y el tracto biliar extrahepático (De Oliveira *et al.*, 1998, Matsuda *et al.*, 2009). La esofagografía, la manometría esofágica y el enema de colon son los procedimientos diagnósticos más utilizados para determinar el compromiso gastrointestinal en pacientes con síntomas (Pérez-Molina y Molina, 2018).

La forma mixta, es decir la combinación de manifestaciones cardíacas y gastrointestinales es la menos frecuente, ocurriendo sólo en un 5 a un 20% de los pacientes con CCC (Pérez-Molina y Molina, 2018).



**Figura 1.1.1. Fases y manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas.** Luego de la infección con *T. cruzi*, se desarrolla la fase aguda de la enfermedad de Chagas que tiene una duración de 1 a 2 semanas y se caracteriza por presentar síntomas leves e inespecíficos. Posteriormente, se desarrolla la fase crónica en la cual los pacientes pueden permanecer sin signos ni síntomas, o presentar sintomatología cardíaca, digestiva o una combinación de ambas. Adaptado de *Bern, 2015*. Creado con BioRender.com.

---

#### **1.1.4. Ciclo de vida e infección de *Trypanosoma cruzi*.**

*T. cruzi* es un protista y parásito intracelular obligado perteneciente al orden Kinetoplastide, familia Trypanosomatidea. Su ciclo de vida es complejo, y para completarse requiere de un huésped intermediario invertebrado, el vector insecto hematófago (triatomino) y un hospedero mamífero definitivo (**Figura 1.1.2**). Al alimentarse de un animal infectado, un insecto vector ingiere junto con la sangre, tripomastigotes circulantes y éstos llegan hasta el intestino medio. Allí se diferencian a la forma epimastigote, e inician su replicación por mitosis. El siguiente paso en el ciclo implica cambios que permiten que el parásito salga del ciclo replicativo y se desplace hacia el intestino posterior del insecto. Una vez allí, se adhiere por interacción hidrofóbica a la cutícula de la pared del órgano e inicia su diferenciación a la forma tripomastigote metacíclico, para luego desprenderse y ser excretado junto con las heces del insecto. La herida que genera el insecto al alimentarse puede contaminarse con estas heces, constituyendo el punto de entrada más frecuente de *T. cruzi* al hospedero mamífero (Rassi Jr *et al.*, 2010).

Los tripomastigotes metacíclicos son capaces de invadir una gran variedad de células nucleadas del organismo de un mamífero, como cardiomiocitos, células de la musculatura lisa y esquelética, células endoteliales, células del sistema nervioso y adipocitos (Tyler y Engman, 2001, Machado *et al.*, 2012). La interacción con la célula a invadir se inicia mediante un número de proteínas de membrana que funcionan como ligandos de componentes de la superficie del parásito. En particular, destacan varios miembros de la superfamilia gp85/trans-sialidasa (TS) (Weinkauff *et al.*, 2011, Walker *et al.*, 2014). Proteínas de este grupo, junto con una proteína denominada penetrina, unen moléculas de la matriz extracelular y esto también tiene implicancias en el proceso de invasión. Una forma alternativa del parásito para ingresar al organismo, y quizás la de mayor relevancia en la infección por piel o mucosas externas, es la fagocitosis, especialmente por parte de macrófagos. Al ser fagocitados, los parásitos quedan inicialmente retenidos en vacuolas parasitóforas, donde son eventualmente eliminados por el estrés oxidativo mediado por especies reactivas de nitrógeno (óxido nítrico [NO] y

peroxinitrito) generadas por las células del huésped. Sin embargo, *T. cruzi* ha desarrollado, a lo largo de su evolución, mecanismos que permiten la detoxificación de estas especies (discutidos en mayor profundidad más adelante) y, a medida que la vacuola parasitófora madura para convertirse en fagolisosoma, escapar al citoplasma, poniéndose a resguardo de los radicales antimicrobianos (Walker *et al.*, 2014). En este proceso aparecen también involucradas las TSs, que al quitar el ácido siálico de proteínas presentes en el interior de la vacuola parasitófora, facilitan la acción de la hemolisina de *T. cruzi* (TcTox), enzima encargada de desorganizar la membrana vacuolar y favorecen el escape del parásito (Rubin-de-Celis *et al.*, 2006). Una vez en el citoplasma, el tripomastigote se diferencia a amastigote, y prolifera formando cúmulos denominados pseudoquistes. Los pseudoquistes suelen crecer hasta ocupar prácticamente todo el volumen de la célula, y los amastigotes se diferencian nuevamente para convertirse en tripomastigotes sanguíneos. Finalmente, al romperse la membrana de la célula infectada/pseudoquiste, los parásitos son liberados al medio extracelular, permitiendo la infección de nuevas células o el acceso al torrente sanguíneo, desde donde podrían potencialmente ser ingeridos por vectores hematófagos (Tyler y Engman, 2001, Rassi Jr *et al.*, 2010, Bern, 2015).

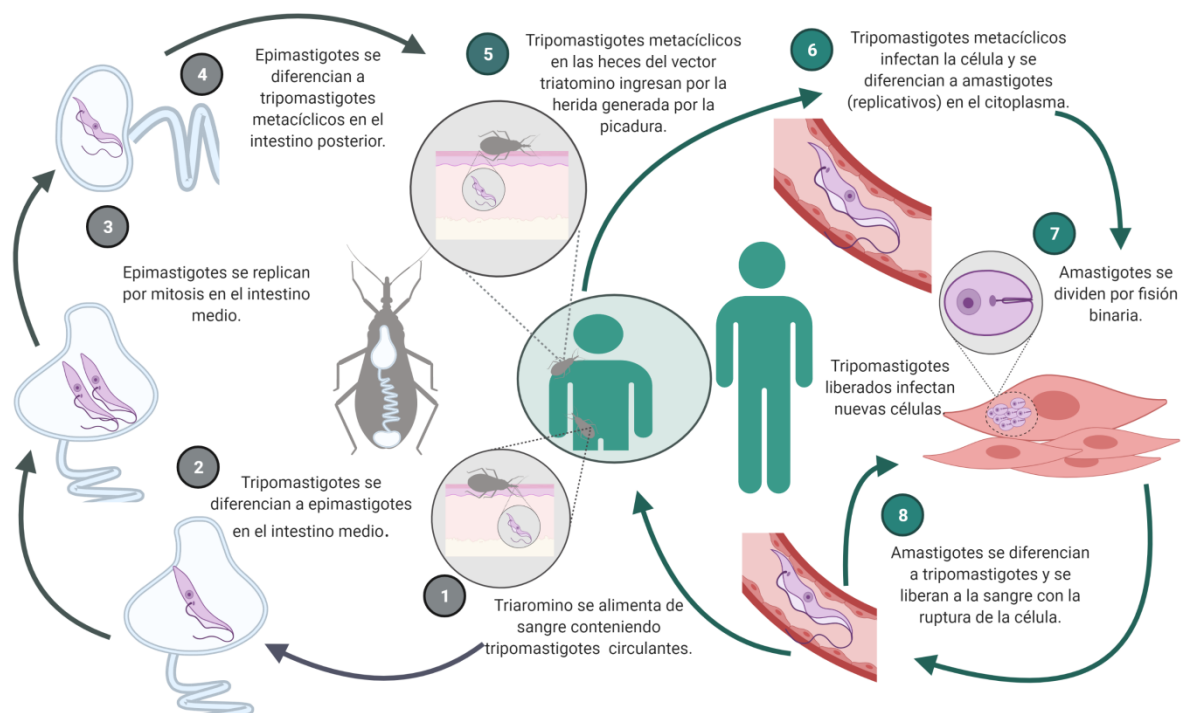


Figura 1.1.2: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Se representa en este esquema el ciclo biológico de *T. cruzi*, mostrando los diferentes estadios en el insecto vector (triatomino) y en el huésped mamífero. Creado con BioRender.com.



### 1.1.5. Patogénesis.

Durante la etapa aguda de la enfermedad, el daño generado en los órganos constituye una consecuencia secundaria a la acción directa del parásito y a la respuesta inflamatoria aguda desarrollada (Pérez-Molina y Molina, 2018).

Una de las cuestiones centrales sobre el curso clínico de la enfermedad de Chagas que se ha tratado de responder, es la razón por la cual el 30% de los pacientes en la fase crónica de la enfermedad no logran mantener controlada la infección en la forma sin manifestaciones clínicas, conduciendo al desarrollo de la forma sintomática. La patogénesis de la EChC involucra varios factores como la persistencia del parásito en diferentes tejidos (cardíaco, adiposo), la parasitemia baja, pero continua, el daño cardíaco mediado por la respuesta inflamatoria desarrollada, la disfunción microvascular y neurogénica y la respuesta autoreactiva generada por el parásito (Nunes *et al.*, 2013, Pérez-Molina y Molina, 2018). Existen actualmente dos hipótesis principales que explican la patogénesis de las lesiones desarrolladas en la infección crónica con *T. cruzi*: la primera postula que el daño tisular es una consecuencia directa de la presencia continua del parásito al generar un estado de inflamación crónica, mientras que la segunda pone el foco en la presencia de una respuesta autorreactiva, generada por mecanismos de mimetismo molecular entre moléculas de *T. cruzi* y componentes propios del huésped. Lo cierto es que estas dos hipótesis no son mutuamente excluyentes y se cree que todos estos factores contribuyen conjuntamente a la progresión de la enfermedad (Cunha-Neto *et al.*, 2006, Kierszenbaum, 2007) (**Figura 1.1.3**).

Independientemente de los mecanismos involucrados en la patología, la respuesta inmune desarrollada por el organismo huésped y su interacción con el parásito tienen un rol clave en todas las fases de la enfermedad. En este sentido, es importante considerar que la respuesta inmune con sus variados perfiles de activación depende de diversos factores inherentes tanto al parásito como al huésped. Entre estos factores se destacan la carga parasitaria inicial, la vía o ruta de infección, la posibilidad de reinfección, el linaje o UDT del inóculo de *T. cruzi* (que está asociado a la presencia o ausencia de ciertos factores de virulencia), la respuesta inmune inicial desarrollada por el huésped, la influencia de factores neuro-endócrinos y el contexto genético del individuo (Coura y Borges-Pereira, 2010, Machado *et al.*, 2012, Morrot *et al.*, 2016).

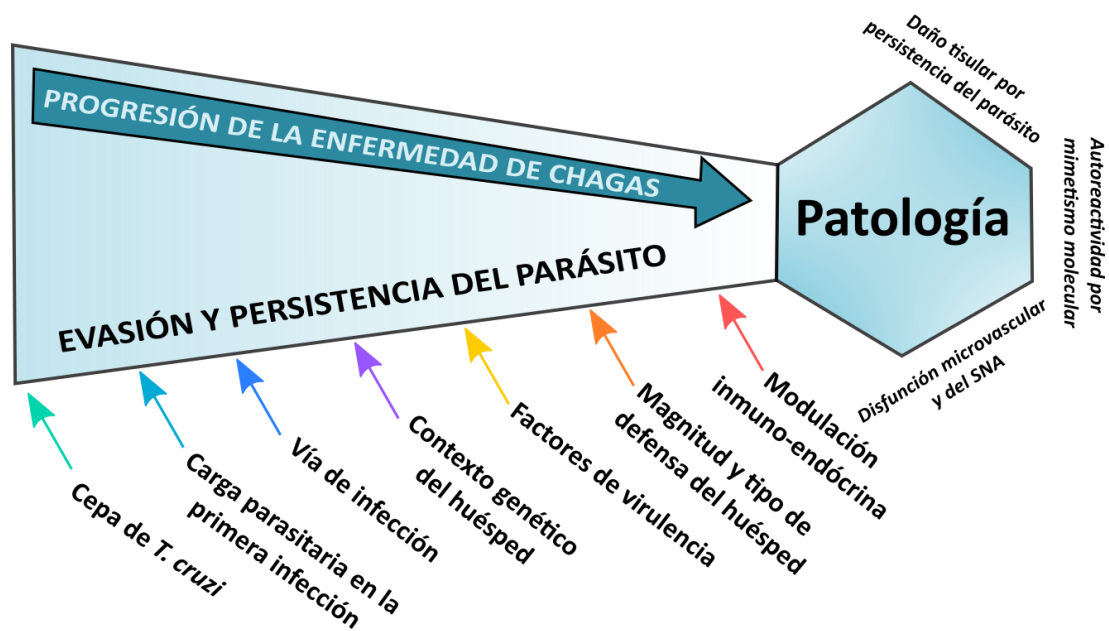


Figura 1.1.3: Mecanismos involucrados en la patogénesis de la Enfermedad de Chagas crónica. Se representan en este esquema las principales hipótesis planteadas para explicar la patogénesis de la infección con *T. cruzi*, así como los diversos factores inherentes tanto al parásito como al huésped, que estarían asociados a la progresión de la enfermedad y al desarrollo de sintomatología en el 30% de los pacientes infectados. SNA: sistema nervioso autónomo. Adaptado de Morrot *et al.*, 2016.

## 1.2. Respuesta inmune en la infección por *Trypanosoma cruzi*.

### 1.2.1 Generalidades.

En respuesta a la infección con *T. cruzi*, el sistema inmune del huésped mamífero genera una potente respuesta inflamatoria, que durante la fase aguda de la enfermedad logra controlar la parasitemia y erradicar los síntomas iniciales, llevando al organismo a un nuevo estado de equilibrio. Como en otras enfermedades infecciosas, diversos mecanismos de la respuesta inmune son subvertidos o evadidos por el parásito, como consecuencia de la co-evolución de ambos organismos. Estos mecanismos de evasión de la respuesta inmune desplegados por *T. cruzi* desde el inicio de la infección, evitan la eliminación completa del parásito del organismo sin afectar de manera crítica al huésped y conducen al desarrollo de la cronicidad (Acevedo *et al.*, 2018).

Como se mencionó previamente, uno de los puntos centrales en el estudio de la evolución clínica de la enfermedad es entender que determina que un paciente desarrolle sintomatología o una forma más severa de la enfermedad. A nivel de la respuesta inmune generada, una teoría plausible es que los individuos que permanecen en la forma sin manifestaciones clínicas serían capaces de reducir la carga parasitaria en las etapas tempranas de la infección y a continuación disminuirían paulatinamente la respuesta

inflamatoria de manera de limitar el desarrollo de patología. Por el contrario, aquellos pacientes que desarrollan sintomatología, aunque serían capaces de controlar la parasitemia, no desarrollarían mecanismos inmunomoduladores eficientes, llevando al establecimiento de un estado de inflamación persistente (Dutra y Gollob, 2008). Otra alternativa, es que la diferencia en la evolución clínica de los pacientes se asocie con la calidad de la respuesta inmune generada desde el inicio de la infección, lo que dependería de diversos factores como se mencionó previamente (**Figura 1.1.3**).

Si tenemos en cuenta cualquier proceso infeccioso, la respuesta desarrollada por el sistema inmunológico integrará mecanismos propios de la inmunidad innata y adaptativa. Si bien estas dos “ramas” de la respuesta inmune actúan en una interdependencia estrecha, resulta útil dividir las para facilitar su estudio y comprensión. En este sentido, cuando hablamos de inmunidad innata nos referimos al conjunto de mecanismos celulares y bioquímicos que constituyen la primera línea de defensa del huésped. Estos mecanismos son pre-existentes, se activan de manera rápida y se caracterizan por responder de la misma forma frente a exposiciones reiteradas de un mismo patógeno. Por otro lado, la inmunidad adaptativa, que está compuesta por los linfocitos T y B, se caracteriza por una respuesta que idealmente, aumenta de magnitud y eficacia frente a la exposición reiterada a un mismo patógeno. Se define por dos características principales: una especificidad extremadamente fina por moléculas o partes de moléculas particulares y una capacidad de “recordar” tales moléculas o partes de moléculas para permitir una respuesta que aumenta su eficacia frente a la re-exposición (Abbas *et al.*, 2014). A diferencia de los componentes celulares de la respuesta inmune innata que reconocen un pequeño número de motivos conservados en los microorganismos, los linfocitos T y B reconocen motivos particulares presentes en los patógenos. Para que este reconocimiento se lleve a cabo, se emplea un repertorio amplio y variado de receptores antigénicos distribuidos clonalmente en los linfocitos. Cada clon B o T reconocerá un único motivo o epítipo antigénico a través de su receptor B (BCR) o T (TCR). Este repertorio se desarrolla durante un proceso denominado ontogenia linfocitaria que transcurre, para los linfocitos T en el timo y para los linfocitos B en la médula ósea (MO) y el bazo (Abbas *et al.*, 2014).

El control de la infección con *T. cruzi* involucra la participación de la respuesta inmune innata y adaptativa tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad (Tarleton, 2007, Machado *et al.*, 2012, Acevedo *et al.*, 2018). Los componentes y mecanismos específicos de cada tipo de inmunidad y su interacción con *T. cruzi* serán detallados a continuación en los apartados correspondientes.

### 1.2.2. Respuesta inmune innata.

La inmunidad innata es capaz de responder rápidamente a una infección y está constituida por varios elementos:

- las barreras físicas y químicas como la piel y los epitelios (de los aparatos respiratorio, digestivo y genitourinario), que impiden la penetración de microorganismos y producen sustancias con actividad microbiostática y microbicida;

- las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), las células dendríticas y los linfocitos asesinos naturales (NK, por *natural killers*);

- el sistema de complemento y otros mediadores de inflamación;

- las citoquinas y quimioquinas, moléculas encargadas de señalizar y coordinar mecanismos de la inmunidad innata.

Los macrófagos y neutrófilos son células especializadas en la fagocitosis que constituyen la primera línea de defensa frente a los agentes patógenos que logran atravesar la barrera de los epitelios. Poseen dos funciones esenciales: el reconocimiento, internalización y destrucción de microorganismos, y la secreción de citoquinas, que promueven la inflamación y potencian la activación de otras células en el sitio de infección, permitiendo el enlace con la respuesta inmune adaptativa. Estas células pueden reconocer estructuras comunes a un amplio grupo de microorganismos, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o a daño (DAMPs), mediante receptores de reconocimiento de patrones (RRP) presentes en su membrana o en compartimientos intracelulares. Entre estos RRP se encuentran los receptores de tipo Toll (TLRs) (Takeuchi y Akira, 2010, Abbas *et al.*, 2014).

Las células dendríticas, al igual que los macrófagos y neutrófilos, se activan en presencia de PAMPs y DAMPs. Se encuentran constitutivamente presentes en los epitelios y la mayoría de los tejidos del cuerpo, es decir, estratégicamente ubicadas para la detección del ingreso de patógenos. Su función más sobresaliente es la de iniciar y dirigir la respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T, que a su vez está estrechamente vinculada con su propio rol en la respuesta inmune innata: capturar antígenos proteicos, transportarlos a los nódulos linfáticos (donde se concentran los linfocitos T vírgenes) y presentar dichos antígenos en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), permitiendo su reconocimiento por parte de los linfocitos T. Debido a esto, son consideradas el nexo entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. Una vez activada, una célula dendrítica responde expresando moléculas coestimuladoras

y citoquinas, necesarias para la activación de los linfocitos T. El perfil de citoquinas producido depende de la naturaleza del patógeno activador y dirige la diferenciación de los linfocitos T vírgenes hacia diferentes perfiles funcionales (Abbas *et al.*, 2014).

Las células NK median la destrucción directa (citotoxicidad) de las células infectadas a través de la acción de granzimas y perforinas, y se destacan además por producir citoquinas, particularmente IFN- $\gamma$ , que modulan las funciones efectoras de otras células como macrófagos y linfocitos T colaboradores (Abbas *et al.*, 2014).

La activación de los RRP en los fagocitos pone en marcha distintas funciones celulares que incluyen: la fagocitosis de los microorganismos, la exocitosis de gránulos intracelulares, y la producción de mediadores inflamatorios, como especies reactivas del oxígeno (ROS), NO, péptidos antimicrobianos, citoquinas y quimioquinas. Estas últimas constituyen el componente humoral de la respuesta inmune innata junto con el sistema de complemento y los anticuerpos. El sistema de complemento consiste en un conjunto de proteínas que circulan en el plasma sanguíneo, cuyo funcionamiento está dado por un mecanismo en cascada, en la cual un precursor enzimático (zimógeno) es activado, convirtiéndose en una proteasa activa capaz de gatillar la activación del componente siguiente en el sistema. Todos los mecanismos efectores del complemento dependen de este paso inicial. Se conocen hasta el momento tres vías por las cuales el primer paso de activación puede ocurrir, conocidas como las vías clásicas, alternativa y de las lectinas. Aunque estas vías difieren en los pasos iniciales de sus respectivas cascadas de activación, las tres convergen a la activación de una C3 convertasa y luego una C5 convertasa, que dan lugar a la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) y la subsecuente lisis del patógeno. En síntesis, este sistema conduce a la generación de cuatro funciones básicas: producción de inflamación y reclutamiento de fagocitos en el sitio de infección, opsonización de microorganismos, citotoxicidad directa de distintos tipos celulares y potenciación de la respuesta de linfocitos B (Abbas *et al.*, 2014).

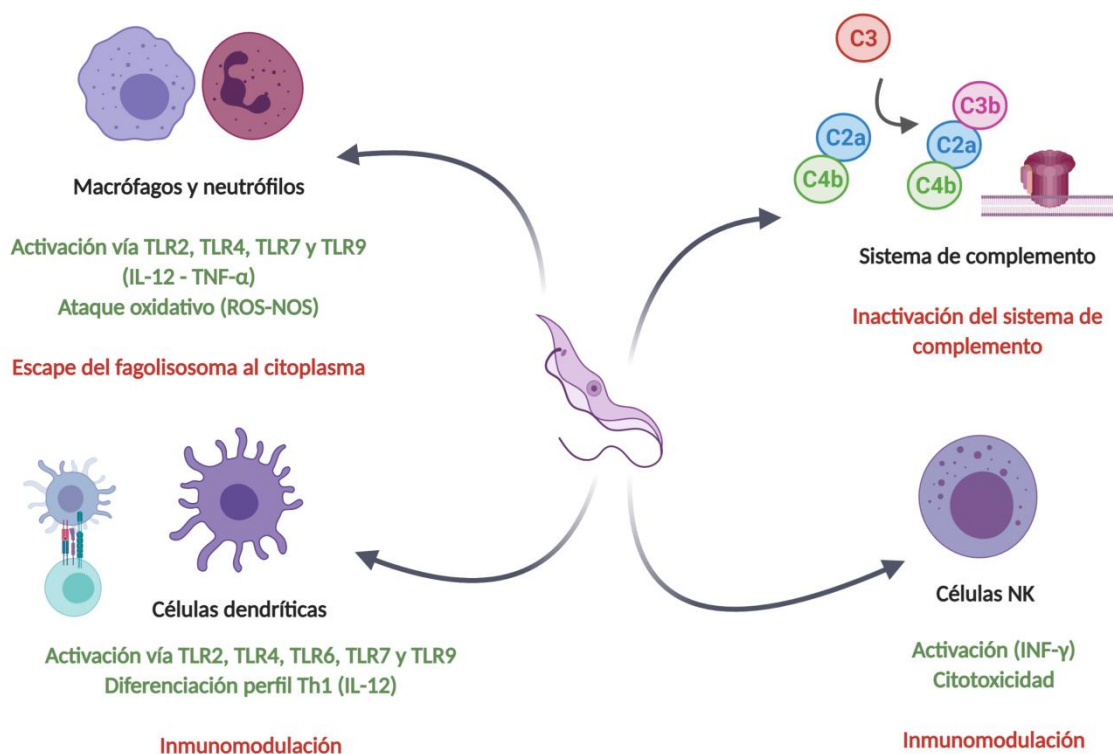
### **1.2.3. La respuesta inmune innata en la infección con *T. cruzi*.**

La respuesta inmune innata cumple un rol fundamental en dos aspectos de la enfermedad de Chagas: el control de la replicación del parásito y su propagación en los distintos tejidos del huésped, y la reacción inflamatoria en los órganos infectados, que como se mencionó previamente constituye la principal causa de daño. La membrana plasmática del tripomastigote infectivo está cubierta por una capa de glicoconjugados anclados a glicosilfosfatidilinositol (GPI), que incluyen las principales familias de

glicoproteínas como mucinas, proteínas de superficie asociadas a mucinas (MASPs) y TSs, así como glicolípidos, entre ellos los glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) (Buscaglia *et al.*, 2006, Acosta-Serrano *et al.*, 2007, Giorgi y de Lederkremer, 2011). Una vez que ocurre la infección, estos componentes extracelulares del parásito estimulan RRP como TLR2 y TLR4 en macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y células NK e inducen la activación de estas células (Ouasssi *et al.*, 2002, Gazzinelli y Denkers, 2006, Rodrigues *et al.*, 2012). El parásito es internalizado por diversos mecanismos que confluyen en el fagolisosoma, donde las moléculas de ADN y ARN son reconocidas por los TLR7 y TLR9. La unión de las distintas moléculas del parásito a estos receptores promueve la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, lo que conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias, principalmente IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , así como moléculas efectoras que controlan la replicación del parásito. A su vez, la acidificación del lisosoma promueve el escape de *T. cruzi* al citoplasma, donde se diferencia a la forma replicativa o amastigote. La replicación del amastigote conduce a la activación del inflammasoma, un complejo multiproteico que también induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Al mismo tiempo, las células dendríticas, que constituyen el puente entre la respuesta innata y la adaptativa, también producen citoquinas, mayormente IL-12, que inducen la diferenciación y la expansión clonal de las células de la inmunidad adaptativa: células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> y células B (Chevallard *et al.*, 2018). Por su parte, las células NK, no sólo son una importante fuente de IFN- $\gamma$  que permite la activación de macrófagos y la diferenciación del perfil de linfocitos T, sino que son capaces de eliminar parásitos en su forma extracelular libre, mediante un mecanismo de citotoxicidad independiente de perforina, contribuyendo directamente al control temprano de la parasitemia en la fase aguda (Cardillo *et al.*, 1996, Lieke *et al.*, 2006).

*T. cruzi* posee una batería de mecanismos que inactivan o bloquean a los distintos actores de la respuesta inmune innata. Como se mencionó previamente, una vez que el parásito es internalizado por los fagocitos, se produce la fusión entre la vacuola parasitófora y los lisosomas. En este punto, la supervivencia de *T. cruzi* dentro de la célula está mediada por una compleja red de enzimas antioxidantes como peroxidasas (Prxs) y superóxido dismutasas (SODs) que lo protegen del ataque oxidativo de ROS y de las especies reactivas del nitrógeno (NOS) (Piacenza *et al.*, 2009, Piacenza *et al.*, 2013). De hecho, la acidificación del ambiente lisosomal es una señal para la activación de mecanismos que le permiten al tripomastigote infectivo escapar del fagosoma al citoplasma y diferenciarse a amastigote para continuar con su ciclo biológico. Luego de una primera ronda de multiplicación intracelular y lisis de la célula huésped, los

tripomastigotes alcanzan la circulación sanguínea, donde se vuelven blanco del sistema de complemento. Sin embargo, se sabe que cuentan con mecanismos para evadir la lisis y opsonización mediada por el sistema de complemento con la ayuda de diversas proteínas presentes en su superficie, como calreticulina, la glicoproteína de envoltura GP160 y el factor acelerador de la degradación de tripomastigotes (T-DAF) (Norris *et al.*, 1991, Tambourgi *et al.*, 1993, Ferreira *et al.*, 2004, Sosoniuk *et al.*, 2014). Estas proteínas impiden la activación inicial de los mediadores de las vías clásica, alternativa y de las lectinas del sistema de complemento o inhiben la formación de la enzima C3 convertasa, que constituye el nodo entre las tres vías (Cardoso *et al.*, 2016). Además de una acción evasiva directa sobre diversos componentes del sistema inmune, existe otro mecanismo que contribuye a la supervivencia del parásito en el organismo huésped: la inmunomodulación. Esta estrategia se basa en deprimir o disminuir determinados componentes o funciones de la respuesta inmune generada. En particular, experimentos con células dendríticas humanas han permitido observar que su función es afectada por factores secretorios del parásito, induciendo un perfil tolerogénico al disminuir la producción de IL-12, TNF- $\alpha$  así como la capacidad de presentación antigénica (Van Overtvelt *et al.*, 1999, Overtvelt *et al.*, 2002). Se ha logrado atribuir estos efectos, al menos parcialmente, a GPIs del parásito (Brodszyn *et al.*, 2002). La **Figura 1.2.1** resume los mecanismos de la respuesta inmune innata involucrados en la infección con *T. cruzi*.



---

Figura 1.2.1: Principales mecanismos de la respuesta inmune innata involucrados en el control y la supervivencia de *T. cruzi* en el huésped. Se representan de forma resumida en color verde los principales mecanismos asociados con el control de la infección mediado por los componentes de la respuesta inmune innata y en color rojo aquellos mecanismos relacionados con la evasión y la inmunomodulación ejercida por el parásito para su supervivencia. Creado con BioRender.com.

---

#### 1.2.4. Respuesta inmune adaptativa: Linfocitos T.

Los linfocitos T constituyen uno de los elementos celulares de la respuesta inmune adaptativa. Estas células reconocen péptidos derivados de proteínas antigénicas presentados por unas moléculas especializadas, que conforman el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Estas moléculas del CMH pueden ser de clase I, las cuales se expresan prácticamente en todas las células nucleadas del organismo, o de clase II, que sólo se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos profesionales (CPA), que son las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B (Abbas *et al.*, 2014).

La respuesta de linfocitos T se inicia (generalmente) por señales producidas por el reconocimiento de complejos péptido-CMH en la superficie de las células presentadoras de antígenos, mediante el receptor de célula T (TCR). La finalidad de esta activación es generar, a partir de un conjunto relativamente pequeño de linfocitos T vírgenes (*naïve*), que poseen TCRs con especificidades diversas generadas mediante recombinación aleatoria de segmentos génicos, un gran número de linfocitos T efectores funcionales patógeno-específicos. La activación de un linfocito T virgen desencadena su expansión clonal y cambios en la expresión de moléculas, especialmente de receptores de membrana, que le otorgan capacidad efectora. Al expandirse, una fracción mayoritaria mediará funciones efectoras, mientras que una fracción menor se diferenciará a células de memoria, que pueden permanecer por años y permitirán en el futuro una respuesta rápida y eficiente frente a un nuevo encuentro con el microorganismo (Abbas *et al.*, 2014).

Los linfocitos T presentan diferentes perfiles fenotípicos y funcionales. Por un lado, los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, conocidos como linfocitos T colaboradores o Th (por T *helper*), potencian los mecanismos de eliminación de patógenos fagocitados en macrófagos, reclutan otras células, estimulan la inflamación, favorecen las funciones inmunológicas de las mucosas, así como las acciones efectoras de otros linfocitos. Por otro lado, los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, o linfocitos T citotóxicos, eliminan las células infectadas o tumorales (Abbas *et al.*, 2014).



Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> al activarse mediante el reconocimiento antigénico por parte del TCR en el contexto del MHC de clase II, estimulan vía CD40L a las células dendríticas que han entrado en contacto con patógenos y promueven su maduración, así como la producción de quimioquinas y citoquinas polarizadoras de la respuesta, función que es necesaria para la inducción de una respuesta T citotóxica apropiada. Algunos linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados aumentan su expresión de CXCR5 que dirige su migración hacia los folículos linfoides, donde interactúan con los linfocitos B y se diferencian a linfocitos T colaboradores foliculares (Tfh), los cuales a su vez favorecen la selección de linfocitos B específicos e inducen la producción de anticuerpos de alta afinidad. La gran mayoría de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que entran en fase proliferativa gracias a su activación, se diferencian en alguno de los múltiples perfiles de linfocitos Th, adquiriendo diferentes propiedades migratorias y efectoras, e ingresan en circulación para extravasarse en los tejidos periféricos inflamados. Allí, frente al reconocimiento antigénico, producen citoquinas acordes a su perfil para potenciar la actividad de las células inmunitarias localmente presentes (Annunziato y Romagnani, 2009, Sallusto, 2016). El predominio de uno u otro perfil Th dependerá de la naturaleza del patógeno, y permitirá, consecuentemente, activar los mecanismos más convenientes para su eliminación (Annunziato y Romagnani, 2009, Abbas *et al.*, 2014). Estos perfiles se definen en función de la producción de citoquinas y expresión de factores de transcripción característicos (Sallusto, 2016). Así, podemos distinguir dos perfiles más clásicos de linfocitos Th: los Th1 y los Th2. Los primeros producen altos niveles de IFN- $\gamma$ , su factor de transcripción de expresión distintiva es T-bet y potencian la fagocitosis y la producción de anticuerpos opsonizantes y fijadores de complemento, mediando la protección frente a patógenos intracelulares. Por otra parte, los linfocitos Th2, definidos por la expresión de GATA-3, producen IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que activan mecanismos involucrados en la eliminación de helmintos y otros parásitos pluricelulares similares (Annunziato y Romagnani, 2009, Sallusto, 2016). A su vez, y en relación con el tipo de patógeno al que responden, mientras que un perfil Th1 guía hacia la producción de anticuerpos IgM, IgA, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub>, uno Th2 favorece la producción de IgM, IgG<sub>4</sub> e IgE (Annunziato y Romagnani, 2009). Además de los perfiles clásicos de células T colaboradoras, se describió un tercer perfil caracterizado por la producción de IL-17, denominado Th17. Estas células producen IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 y su diferenciación depende de la expresión de los factores de transcripción STAT3, ROR $\gamma$ t y ROR $\alpha$  (Bettelli *et al.*, 2008, Annunziato y Romagnani, 2009). Los estudios en modelos animales y en humanos han demostrado un papel clave de estas células en la defensa frente a bacterias extracelulares y hongos, así como en el

desarrollo de enfermedades autoinmunitarias (Annunziato y Romagnani, 2009, Korn *et al.*, 2009). Asimismo, los mecanismos efectores mediados por las Th17 juegan un papel crítico en la resistencia contra patógenos intracelulares como los protozoos (Vesely *et al.*, 2020). Su importancia fisiológica es aún hoy motivo de debate, puesto que los efectos de su actividad suelen variar dependiendo de la patología de contexto y el modelo en el que se observen (Annunziato y Romagnani, 2009). Asimismo, en los últimos años se describieron otros perfiles de células T colaboradoras, tales como las células Th9 y Th22 (Annunziato y Romagnani, 2009), las cuales no serán tratadas en detalle, pues no son de relevancia para la contextualización de esta Tesis.

En cuanto a la fisiología de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, se sabe que su activación implica el reconocimiento antigénico por parte del TCR en el contexto del CMH de clase I y segundas señales provistas por la CPA, o por otros linfocitos, especialmente linfocitos T colaboradores. El resultado de esta activación es la adquisición de la maquinaria molecular requerida para la eliminación de células blanco, proceso que signa su diferenciación a linfocito T citotóxico. Más específicamente, se trata del desarrollo de gránulos citoplasmáticos conteniendo proteínas como perforinas y granzimas, que permitirán al linfocito la destrucción de otras células infectadas o del propio microorganismo. Adicionalmente, se activa la producción de citoquinas, principalmente IFN- $\gamma$  (Abbas *et al.*, 2014).

Existe un subconjunto de linfocitos T CD4<sup>+</sup> cuya función es la de operar mecanismos de tolerancia con el fin de restringir respuestas inmunes potencialmente patogénicas. Esta población, conocida como linfocitos T regulatorios (Treg), expresa constitutivamente una alta densidad del receptor de IL-2 (CD25) y del factor de transcripción FoxP3, que dirige su programación transcripcional (Josefowicz *et al.*, 2012, Abbas *et al.*, 2014). En condiciones fisiológicas, se generan principalmente por reconocimiento de autoantígenos en el timo, así como de antígenos propios y foráneos en los órganos linfoides periféricos. Su función inmunoregulatoria está mediada por IL-10 y TGF- $\beta$ ; IL-10 inhibe la producción de IL-12 y la expresión de moléculas co-estimuladoras y moléculas del CMH clase II en las células dendríticas y macrófagos activados, mientras que TGF- $\beta$  inhibe la proliferación y función efectora de los linfocitos T y macrófagos, inhibe la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados hacia Th1 y Th2, induce el cambio de clase hacia IgA en linfocitos B activados y promueve la reparación local de tejido en la remisión de la inflamación (Abbas *et al.*, 2014).

### 1.2.5. Respuesta de linfocitos T en la infección con *T. cruzi*.

A propósito de la respuesta de linfocitos T en la enfermedad de Chagas, tal como se mencionó previamente, la estimulación de receptores como TLR7 y TLR9 presentes en las células dendríticas, induce la maduración de las mismas, que junto con la producción de IL-12 conduce a la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> colaboradores hacia un perfil de tipo Th1, característico de las infecciones con parásitos intracelulares (Brenner y Gazzinelli, 1997, Golgher y Gazzinelli, 2004, Junqueira *et al.*, 2010). Se sabe que en el modelo murino de infección crónica por *T. cruzi*, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> forman una parte importante de los infiltrados en las lesiones cardíacas, lo cual podría sugerir que son de importancia en la respuesta frente al parásito (Younès-Chennoufi *et al.*, 1988). No obstante, se conoce muy poco sobre el rol que cumplen en la enfermedad de Chagas, especialmente en comparación con la extensión en la que ha sido estudiada la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. En la infección humana, (Albareda *et al.*, 2009) demostraron una asociación negativa entre la frecuencia de linfocitos CD4<sup>+</sup> específicos contra *T. cruzi* productores de IFN- $\gamma$  y el grado de severidad de pacientes con CCC. Adicionalmente, experimentos de estimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (CMN) mostraron que los antígenos del parásito inducen en pacientes con CCC, un perfil de secreción de citoquinas que incluye una mezcla típicamente Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4, IL-13), además de IL-2, IL-10 (que tiene función inmunosupresora, como se discute más adelante) y GM-CSF (una citoquina que favorece la producción de neutrófilos y monocitos en la médula ósea [MO] y la diferenciación de las células de Langerhans en células dendríticas maduras) (Longhi *et al.*, 2014).

La respuesta de tipo Th1 generada en la etapa aguda persiste durante la fase crónica de la enfermedad y conduce a la generación de células T CD8<sup>+</sup> específicas para *T. cruzi*, que responden a un conjunto pequeño de epítopes presentes en el parásito. Esta característica se denomina inmunodominancia, y es una marca distintiva de la respuesta de linfocitos T contra *T. cruzi* (Tarleton, 2007). Se sabe que estos epítopes inmunodominantes derivan principalmente de la proteína cruzipaína y de proteínas de la familia de las TSs, y que son importantes en el control de la parasitemia y la carga parasitaria en tejido (Rodrigues *et al.*, 2009, Rosenberg *et al.*, 2010). Sin embargo, se cree que el fenómeno de inmunodominancia con el consecuente repertorio limitado de células T CD8<sup>+</sup> específicas contra el parásito, constituiría uno de los mecanismos de evasión y persistencia de *T. cruzi* (Rodrigues *et al.*, 2009). Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos permiten el control de la infección principalmente a través de la producción de IFN- $\gamma$ , pero también

a través de la actividad citotóxica sobre las células infectadas mediada por perforina (de Alencar *et al.*, 2009). Se ha comprobado que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son un componente esencial en el control de la infección (Junqueira *et al.*, 2010), tal como se evidencia en modelos de ratón con esta población eliminada mediante anticuerpos (Tarleton, 1990) y en transgénicos deficientes en linfocitos T CD8<sup>+</sup> que no logran sobrevivir a la fase aguda de la infección (Tarleton *et al.*, 1992). En la infección humana, se ha comprobado una reducción en la frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en pacientes con cardiopatía severa respecto de los pacientes asintomáticos y con cardiopatía moderada, sugiriendo que la respuesta T citotóxica juega un rol en prevenir el avance de la sintomatología cardíaca (Albareda *et al.*, 2006).

Además de participar en la eliminación del parásito en el marco de la infección, existe evidencia que sugiere que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> están también involucrados en el daño tisular y los procesos inflamatorios característicos de la enfermedad de Chagas sintomática (Engman y Leon, 2002, Bonney y Engman, 2015). La producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos Th1 y los T CD8<sup>+</sup> específicos es esencial para el control de la infección, pero también constituye el principal factor responsable de la inflamación exacerbada que conduce al daño tisular (Junqueira *et al.*, 2010). En el marco de la EChC, se ha observado que los pacientes tanto asintomáticos como con cardiopatía poseen una frecuencia aumentada de linfocitos T activados circulantes, y que estas células secretan citoquinas pro- y anti-inflamatorias (Dutra y Gollob, 2008), lo que indicaría una regulación activa de la respuesta frente a la infección. Por otra parte, diversos estudios muestran que los pacientes con la forma sin manifestaciones clínicas presentan un balance de citoquinas que favorece un estado anti-inflamatorio, mientras que en aquellos pacientes con compromiso cardíaco se observa un estado pro-inflamatorio en el que mayores niveles de citoquinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  correlacionan con una patología más severa (Souza *et al.*, 2007, Cunha-Neto *et al.*, 2009). Otros estudios comparativos del perfil de citoquinas entre pacientes asintomáticos y con cardiopatía arrojaron resultados discordantes: algunos autores afirman que la secreción de IFN- $\gamma$  tiene un efecto protector frente al desarrollo de sintomatología (Laucella *et al.*, 2004, dos Santos Virgilio *et al.*, 2014, Dutra *et al.*, 2014), mientras que otros proponen un efecto nocivo de esta citoquina pro-inflamatoria sobre la función cardíaca (Gomes *et al.*, 2003, Gomes *et al.*, 2005).

A propósito de los mecanismos que favorecen la cronicidad y la persistencia del parásito en el huésped, es importante mencionar que en la infección aguda con *T. cruzi* existe cierto retraso en el desarrollo de la respuesta adaptativa con respecto a los tiempos habituales observados para virus y bacterias (Tzelepis *et al.*, 2006). Sumado a

esto, las evidencias sugieren que la aparición de una respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específica contra epítopes del parásito no implica protección frente a la infección/reinfección. Una explicación factible para este fenómeno es que la infección inicial podría pasar desapercibida para el sistema inmune, y por ende no ocurra una activación efectiva de la respuesta innata antes de la primera ronda de replicación y reinfección celular, que tiene lugar alrededor de 4-5 días post-infección (Tzelepis *et al.*, 2006, Padilla *et al.*, 2009). Se han mencionado tres aspectos que podrían contribuir a esta entrada silenciosa del parásito durante la primera ronda de replicación en las células del huésped: la cinética relativamente lenta del ciclo de vida intracelular, el escape del fagolisosoma y la inmunomodulación mediada por TLR2 y TLR6 en las células dendríticas (Cardoso *et al.*, 2016). A esta posible dificultad para generar una respuesta efectiva en el contexto de la infección primaria, se suma el efecto de la estimulación antigénica persistente propia de la infección crónica sobre el mantenimiento de una población de memoria funcional. Este fenómeno se conoce como agotamiento de los linfocitos T (a los linfocitos T afectados por este proceso se los denomina “exhaustos”) y tiene como consecuencia la pérdida de funcionalidad o capacidad efectora de los linfocitos específicos contra el antígeno persistente, desarreglos metabólicos y la expresión mantenida de receptores tales como PD-1, CTLA-4, Tim-3, Lag-3, TIGIT, CD160 y CD244, todas moléculas implicadas en el control de la inflamación y contracción de las poblaciones efectoras (Wherry y Kurachi, 2015, Anderson *et al.*, 2016). Estudios con muestras de pacientes con EChC han mostrado presencia de linfocitos T exhaustos, exhibiendo una relación directa entre su frecuencia y la severidad de la cardiopatía (Lauella *et al.*, 2004, Albareda *et al.*, 2013, Lasso *et al.*, 2015, Alcaraz *et al.*, 2019). La **Figura 1.2.2** resume los mecanismos de la respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T en la infección con *T. cruzi*.

Dada la relevancia clínica del control de la inflamación exacerbada en la EChC, los linfocitos Treg han despertado interés en este campo de investigación. Se determinó que esta población de linfocitos está aumentada y correlaciona con una mejor función cardíaca en pacientes con la forma sin manifestaciones clínicas en comparación con aquellos que desarrollan sintomatología cardíaca o digestiva (Vitelli-Avelar *et al.*, 2005, da Silveira *et al.*, 2009, de Araujo *et al.*, 2011). Asimismo, se comprobó que los linfocitos Treg de los pacientes con la forma sin manifestaciones clínicas presentan actividad supresora de la proliferación y producen mayores niveles de IL-10, IL-17 y Granzima B que los Treg de los pacientes con cardiopatía asociada a la infección e individuos no infectados. Por otra parte, las células Treg de los pacientes con CCC expresan mayores

niveles de CTLA-4 (De Araujo *et al.*, 2012). Más recientemente, se demostró que las células Treg de los pacientes sin manifestaciones clínicas expresan niveles más altos de las moléculas inhibitorias CD39 y CD95L en comparación con los pacientes con CCC, mientras que éstos últimos muestran mayor expresión de PD-1, indicando que distintos mecanismos de supresión mediados por estas células estarían asociados con las distintas formas clínicas de la EChC (Damasio *et al.*, 2019).

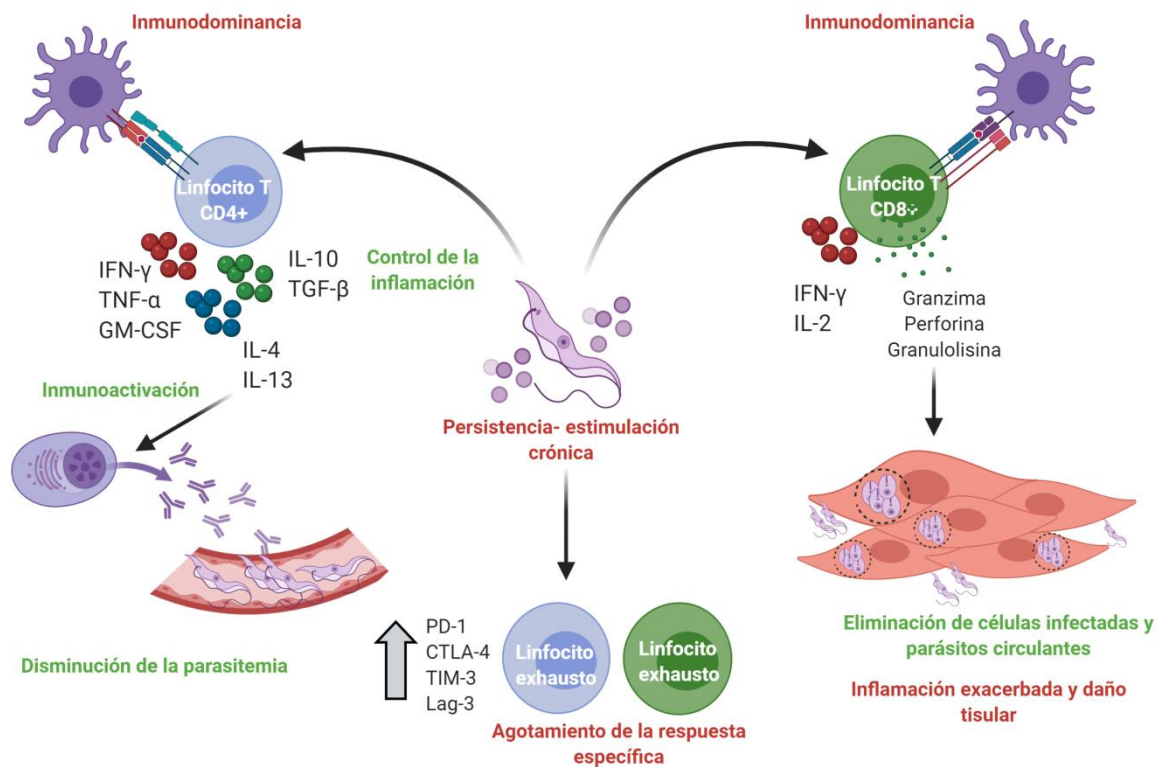


Figura 1.2.2: Principales mecanismos de la respuesta inmune adaptativa de linfocitos T involucrados en el control y la supervivencia de *T. cruzi* en el huésped. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activan, potencian o modulan mecanismos de la respuesta inmune frente a la infección por *T. cruzi*. El control de la enfermedad requiere de una respuesta balanceada en la que existe un compromiso entre la activación de funciones microbicidas y el control del daño inflamatorio. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> juegan un rol fundamental en el control de la parasitemia y la eliminación de células infectadas por *T. cruzi*, pero se cree que participan en los procesos inflamatorios patogénicos propios de la enfermedad de Chagas. La estimulación crónica de ambas poblaciones linfocitarias por antígenos parasitarios perjudica su función. Se representan de forma resumida en color verde los principales mecanismos asociados con el control de la infección mediado por los linfocitos T y en color rojo aquellos mecanismos relacionados con la evasión y la inmunomodulación ejercida por *T. cruzi*. Creado con BioRender.com.

## **1.2.6. Respuesta inmune adaptativa: Linfocitos B.**

### **1.2.6.1 Generalidades.**

El otro componente esencial de la respuesta inmune adaptativa lo constituyen los linfocitos B. Desde un enfoque conceptual histórico de la inmunología, los linfocitos B constituyen las células del sistema inmune capaces de generar una respuesta adaptativa de tipo humoral. En este sentido, se las define como células especializadas en la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas (Igs), función que llevan a cabo una vez diferenciadas en células plasmáticas o plasmocitos. Estos anticuerpos son esenciales para combatir a los microorganismos que se replican en los espacios extracelulares y prevenir la dispersión de los que se multiplican dentro de las células, como es el caso de *T. cruzi*. Asimismo, contribuyen al daño tisular y a la autoinmunidad.

Sin embargo, las últimas décadas de investigación mostraron que estas células son igualmente críticas en la inmunidad celular frente a patógenos, hallándose diversas funciones no dependientes de la producción de anticuerpos. Se sabe que participan en la activación de las células T mediante su función de células presentadoras de antígeno (CPA), a través de la co-estimulación y de la secreción de citoquinas, afectan las defensas antimicrobianas y la inflamación tisular y adicionalmente, ejercen funciones regulatorias que modulan tanto la respuesta humoral como celular. Siguiendo esta línea de pensamiento, las células B no serían receptores pasivos de la colaboración de las células T, sino que participarían activamente en la respuesta inmune celular, modulando la magnitud y la calidad de la respuesta T (Lund y Randall, 2010).

### **1.2.6.2. Clasificación de acuerdo a su ontogenia y localización.**

Existen tanto en ratón como en el humano tres poblaciones de linfocitos B maduros, de acuerdo a su ontogenia y su localización anatómica: los linfocitos B1, los linfocitos B de la zona marginal del bazo (BZM) y linfocitos B foliculares (FO). Los dos últimos se agrupan como linfocitos B2 (Hardy y Hayakawa, 2001) (**Figura 1.2.3**).

Los linfocitos B1 se generan durante el desarrollo embrionario a partir de progenitores localizados en el hígado fetal y persisten como una población capaz de autorenovarse luego del periodo neonatal. Se sabe además, que la MO tiene capacidad de producir en pequeñas cantidades linfocitos B1 en la etapa adulta, desde donde migran mayormente a las cavidades peritoneal y pleural y en menor proporción, a los órganos linfáticos secundarios (OLS) y sangre periférica (Montecino-Rodriguez y Dorshkind,

2012, Montecino-Rodriguez *et al.*, 2016). La función principal de esta población es la generación de una primera línea de defensa a través de la secreción espontánea de anticuerpos naturales, manteniendo niveles de inmunoglobulinas basales de tipo IgM e IgD en ausencia de estimulación antigénica o inmunización, dando tiempo a la generación de anticuerpos específicos. Estos anticuerpos naturales se unen con baja afinidad y son polirreactivos, es decir, reconocen epítopes compartidos por moléculas diferentes. Se generan contra antígenos no proteicos, como polisacáridos, fosfatidilcolina y lipopolisacáridos, los cuales se denominan antígenos TI o T independientes (por *thymus independent*). Más recientemente, se descubrió que los linfocitos B1 pueden realizar cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y generar distintos tipos de IgG e IgA frente a antígenos TI (Genestier *et al.*, 2007). Se estima que entre el 80-90% de IgM y 50% de IgA en el plasma es producido por las células B1 (Rothstein *et al.*, 2013). En cuanto a la estructura molecular de estos anticuerpos, se sabe que tanto la hipermutación somática como las modificaciones de la región N-terminal son mínimas o nulas, por lo que mantienen las secuencias de la línea germinal (Ehrenstein y Notley, 2010). Dado el amplio espectro de especificidad de los anticuerpos producidos por los linfocitos B1, también se asoció a esta población con mecanismos de autoinmunidad (Hayakawa *et al.*, 1983). Otro rasgo interesante de los linfocitos B1 es que representan a la única población de origen linfocítico capaz de diferenciarse a un tipo celular fagocítico, las células B1-CDP (célula fagocítica derivada de linfocito B1), que al igual que los macrófagos pueden migrar a los sitios inflamatorios (Almeida *et al.*, 2001).

Los linfocitos B1 en ratón, se diferenciaron históricamente por la presencia de CD5 en membrana, si bien más tarde se descubrió la existencia de linfocitos B1 CD5<sup>-</sup>. A partir de ese momento, fueron clasificados en dos poblaciones diferentes de acuerdo a la expresión de este marcador de membrana: los B1a (CD5<sup>+</sup>) y los B1b (CD5<sup>-</sup>) (Hayakawa *et al.*, 1983, Kantor, 1991). En humano, si bien existe una importante población de células B CD5<sup>+</sup> en sangre periférica y mayormente en sangre de cordón umbilical, esta molécula no constituye un marcador de linfocitos B1, sino que la expresión conjunta de CD19, CD27 y CD43 permitiría diferenciar a esta población (Sanz *et al.*, 2008, Griffin *et al.*, 2011). Sin embargo, es importante destacar que esta definición fenotípica de la población B1 fue motivo de controversia, ya que algunos autores postulan la presencia de células CD3<sup>+</sup> (células T) dentro de la población CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> (Baumgarth, 2017). Asimismo, la expresión del marcador CD11b distingue dos poblaciones de linfocitos B1: los B1 CD11b<sup>-</sup> asociados a la producción de anticuerpos y los B1 CD11b<sup>+</sup>, relacionados con la activación de las células T (Griffin *et al.*, 2011).



Los linfocitos BZM se generan a partir de los linfocitos B transicionales en el bazo, a través de la inducción de la proteína Notch2 (*neurogenic locus notch homolog protein 2*) y la unión a su ligando dlk-1 (*protein delta homolog 1*) en las células endoteliales. Si bien no serán tenidos en cuenta en particular en el desarrollo de esta Tesis, es importante mencionar, que al igual que los linfocitos B1, poseen la capacidad de generar anticuerpos naturales polirreactivos de tipo IgM, que facilitan la eliminación de células apoptóticas y de los microorganismos que ingresan al huésped a través de la circulación sanguínea. Las células B1 y BZM actúan como células innatas, generando los primeros anticuerpos IgM y funcionando de puente frente a la brecha temporal, hasta la generación de anticuerpos de tipo IgG específicos provenientes de los linfocitos FO. Adicionalmente y a diferencia de los linfocitos B1, los BZM tienen la capacidad de reaccionar frente a antígenos proteicos (o TD por *thymus dependent*), produciendo anticuerpos de alta afinidad, mediante la colaboración con las células T y la participación de proteínas del sistema de complemento (Phan *et al.*, 2005, Arnon *et al.*, 2013).

Por último, los linfocitos B2 foliculares constituyen la población clásica de la respuesta inmune adaptativa, representando más del 90% de los linfocitos B en sangre periférica y tejidos linfáticos secundarios. Se originan a partir de linfocitos B inmaduros transicionales en el bazo, mediante una vía de señalización dependiente de la proteína Btk (*Bruton's tyrosine kinase*), inducida por señales a través del BCR (Allman y Pillai, 2008). Si bien son capaces de producir anticuerpos naturales de tipo IgM, su función principal es la de reconocer antígenos proteicos (TD) y producir anticuerpos específicos de alta afinidad mediante la colaboración que reciben por parte de las células T.

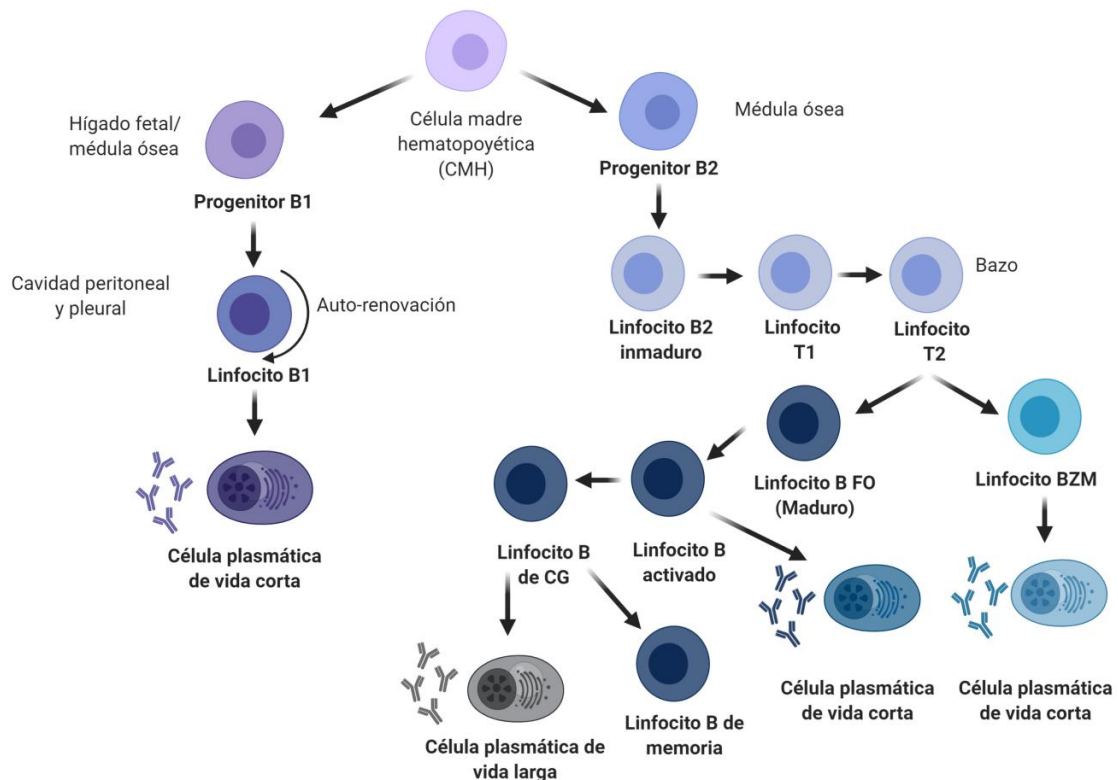


Figura 1.2.3: Clasificación de los linfocitos B de acuerdo a su ontogenia y localización. Los linfocitos B de todos los linajes se originan a partir de progenitores derivados de células madre hematopoyéticas (CMH). Los linfocitos B1 se originan mayormente en el hígado fetal y luego del periodo perinatal permanecen con capacidad de renovación en la médula ósea (MO). Los linfocitos B2 se originan a partir de linfocitos transicionales (T2) derivados de progenitores en la MO, y luego se diferencian en linfocitos B de la zona marginal del bazo (BZM) o linfocitos B foliculares (FO) en el bazo. CG: centro germinal; T1: linfocito B transicional de tipo 1. Creado con BioRender.com.

### 1.2.6.3. Desarrollo de los linfocitos B.

Los linfocitos B, a excepción de los B1, se originan en la MO (Figura 1.2.3) a partir de un progenitor linfoide común (compartido con los linfocitos T y los NK), siendo la expresión del gen *Pax5* la responsable de la determinación del linaje B (Cobaleda *et al.*, 2007). El desarrollo de los linfocitos B depende de la presencia de células estromales en la MO que interactúan de forma estrecha, les proveen una red de sostén, y sintetizan factores de crecimiento, quimioquinas y citoquinas que estimulan su diferenciación y proliferación. La ontogenia de los linfocitos B se genera a través de una serie de pasos secuenciales de maduración dentro de la MO hasta la liberación de linfocitos B transicionales en la circulación sanguínea y la diferenciación final de estos linfocitos transicionales en linfocitos B maduros en el bazo (Thomas *et al.*, 2006). Los distintos estadios de desarrollo se distinguen por la expresión de las cadenas pesadas (H) y livianas (L) de las Igs, así como por la expresión de determinadas moléculas en su superficie. El

paso crítico para el desarrollo de los linfocitos B es la generación del BCR debido a que cada linfocito B maduro va a expresar un único tipo de BCR para un antígeno específico, lo que se denomina distribución clonal del BCR. Se requiere un repertorio amplio de BCR para asegurar la selectividad y especificidad de la respuesta inmune adaptativa. Los loci de los genes para las cadenas H y L de las Igs están compuestos por diversos elementos génicos variables V (“*variable*”), seguidos por diversos segmentos D (“*diversity*”) sólo en la cadena H, segmentos J (“*joining*”) y exones C (región constante) (Tobón *et al.*, 2013).

El proceso de diferenciación en la MO comienza con el estadio pro-B, en el cual se produce el rearreglo del gen que codifica para la cadena pesada (H). Este primer paso se desarrolla en dos etapas: en la primera se asocian los fragmentos  $D_{H-J_H}$  (pro-B temprano) en ambos cromosomas y en la segunda, se une un fragmento  $V_H$  al  $D_{H-J_H}$  previamente rearreglado (pro-B tardío). Esta unión se intenta primero en un cromosoma y si no es exitosa se intenta en el segundo cromosoma, el fenómeno que se conoce como exclusión alélica, que garantiza que sólo se exprese la cadena H de uno de los alelos. Si no hay rearreglo exitoso, el linfocito B muere por apoptosis; en caso contrario, se desarrolla el estadio pre-B, el cual se caracteriza por la generación del pre-receptor de la célula B (pre-BCR). Los linfocitos pre-B inician una etapa de proliferación hasta que comienza el reordenamiento de los genes que codifican la cadena L, que involucran la asociación de los fragmentos  $V_L$  y  $J_L$ . Como existen dos locus distintos para la cadena L, se intenta primero un rearreglo de la  $L_k$  en uno de los cromosomas y si no es exitoso, se rearregla esa misma cadena, en el otro cromosoma. En el caso que ninguno de los dos sea exitoso, comenzarán los rearreglos de la cadena  $L_l$ . Una vez que se produjo con éxito el rearreglo de la cadena L, se sintetiza y se combina con la cadena  $H_{mu}$ . De esta manera se produce la molécula de IgM junto con el heterodímero  $Iga-Igb$  que conforman el BCR del estadio inmaduro pre-B. Una vez que el linfocito B inmaduro expresa el BCR de membrana, los mecanismos de control se orientan hacia la especificidad del receptor y la capacidad de reconocer moléculas propias en el entorno de la MO, lo que se denomina inducción de tolerancia central B. Aquellos linfocitos que reconozcan antígenos propios a través del BCR serán controlados mediante diversos mecanismos que incluyen desde la inducción de un estado de anergia hasta la muerte celular por apoptosis. Por el contrario, aquellos que no reciben señales a través de su BCR, salen de la MO para continuar su proceso de maduración en el bazo. Los linfocitos B que abandonan la MO y se encuentran en la periferia en un estado de transición entre el estadio B inmaduro y maduro, reciben el nombre de linfocitos B transicionales (BTr). En esta etapa, se diferencian dos subpoblaciones: los linfocitos BTr1 y BTr2. Los BTr1 provienen de los inmaduros y se

encuentran tanto en circulación como en el bazo. Estos reciben un proceso de selección negativa si su BCR reconoce moléculas propias, lo que se denomina inducción de tolerancia periférica. Aquellos que sobreviven, dan lugar a los BTr2, a partir de los cuales se originan los linfocitos B maduros de tipo BZM o FO, guiados por señales a través del BCR, principalmente de la molécula BAFF (*B cell activating factor*) y de la expresión de factores de transcripción Notch2 y Btk. Los linfocitos BZM son retenidos en el bazo, mientras que los FO recirculan poblando los diversos OLS (Thomas *et al.*, 2006, Dorshkind y Rawlings, 2018). Una vez que alcanzan el estadio maduro, los linfocitos B co-expresan IgM e IgD en membrana.

#### 1.2.6.4. Linfocitos B transicionales.

El término linfocitos B transicionales se utiliza para denominar a las células B recién emigradas de la MO. Presentan características funcionales asociadas a células B inmaduras, tales como la ausencia de expresión de Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2 protein*) y una capacidad reducida de supervivencia, proliferación, diferenciación y quimiotaxis en comparación con las células B maduras. Adicionalmente, se observó que expresan genes de la región variable de las inmunoglobulinas (Ig V) no mutados (Cuss *et al.*, 2006). Debido a que sólo una pequeña fracción de la población transicional inmadura alcanza con éxito el estadio maduro, representan un punto crucial en la selección del repertorio de linfocitos B maduros y la eliminación de linfocitos B autorreactivos (Carsetti *et al.*, 1995, Loder *et al.*, 1999, Wardemann *et al.*, 2003). Gran parte del conocimiento de la biología de las células B transicionales proviene de los estudios realizados en el modelo murino, los cuales describen tres estadios discretos de diferenciación, T1, T2 y T3 (Loder *et al.*, 1999, Allman *et al.*, 2001). Al igual que en el ratón, los linfocitos B transicionales humanos se localizan en la MO, en sangre periférica y en el bazo. Diversos estudios han intentado discriminar a partir de las características fenotípicas y funcionales, distintas subpoblaciones dentro del compartimento de linfocitos B transicionales, al igual que lo observado previamente en el modelo murino. Independientemente de las discrepancias halladas en torno a los marcadores que identifican a esta población y a los distintos estadios contenidos dentro de este grupo, la característica distintiva de la población de linfocitos B transicionales presentes en sangre periférica es la alta expresión de CD24 y CD38 (Carsetti *et al.*, 2004, Sims *et al.*, 2005, Palanichamy *et al.*, 2009). Estas células representan aproximadamente sólo el 4% de las células B de sangre periférica en humanos. Por el contrario, son muy abundantes en sangre de cordón umbilical, alcanzando cerca del 50% de las células B totales en este órgano. Los hallazgos más actuales en torno a los distintos tipos de linfocitos B transicionales (CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>),

describen 4 subpoblaciones distintas: T1 (inmaduras; CD10<sup>++</sup>IgM<sup>++</sup>IgD<sup>low</sup>) y T2 (intermedias; CD10<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>), ambas diferenciadas por su capacidad de sobrevivir o entrar en apoptosis con la señalización a través del BCR y T3 (estado de reposo; CD10<sup>low</sup>IgM<sup>low</sup>IgD<sup>low</sup>) que expresan bajos niveles de IgM, IgD y CD10 y muestran un estatus funcional similar a las células en estado de anergia. Por último, se describió una subpoblación CD27<sup>+</sup> (memoria activadas; CD80<sup>++</sup>CD86<sup>++</sup>CD40<sup>++</sup>CD25<sup>++</sup>) que responde de manera rápida a estímulos independientes de la colaboración de células T, y secreta anticuerpos naturales de tipo IgM. Esta subpoblación sería consistente con una población de linfocitos B transicionales de tipo innato (Simon *et al.*, 2016).

Las alteraciones en el compartimento de linfocitos B transicionales se describieron tanto en inmunodeficiencia por HIV, inmunodeficiencia variable común (CVID) y linfocitopenia idiopática de células T CD4<sup>+</sup>, como en patologías autoinmunes, entre ellas, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoidea y sarcoidosis (Samuels *et al.*, 2005, Yurasov *et al.*, 2005, Cuss *et al.*, 2006, Malaspina *et al.*, 2006, Malaspina *et al.*, 2007, Saussine *et al.*, 2012). La expansión de la población de células B transicionales en estas patologías se asocia frecuentemente a una disminución de las células B de memoria, al desarrollo de una respuesta humoral deficiente y a procesos de autoinmunidad (Moir y Fauci, 2009, Saussine *et al.*, 2012). Si bien no se conocen con certeza las causas que llevan a esta expansión sostenida, diversos estudios muestran una asociación con el aumento en los niveles circulantes de las moléculas BAFF e IL-7, ambas asociadas a la supervivencia y la diferenciación de las células B inmaduras (Stohl, 2002, Malaspina *et al.*, 2007, Landolt-Marticorena *et al.*, 2011).

#### **1.2.6.5. Activación, diferenciación e inmunidad mediada por linfocitos B.**

La activación de los linfocitos B se inicia cuando los receptores de membrana de tipo IgM o IgD reconocen y se unen a antígenos específicos. Ante la presencia de una infección, las células B vírgenes, es decir, aquellas que no tuvieron experiencia previa con el antígeno, se activan y se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos o células B de memoria. Algunas de estas células migran a la MO, donde permanecen durante varios años y continúan produciendo anticuerpos incluso en ausencia del antígeno. La activación de la célula B y la diferenciación a célula plasmática o célula B de memoria están determinadas por la integración de: la naturaleza del antígeno, las señales a través de TLRs, las citoquinas y las señales co-estimuladoras (Nutt *et al.*, 2015).

Existen dos vías de activación e inicio de la respuesta inmune humoral, que dependen de la naturaleza del antígeno, y como se mencionó previamente, están desarrolladas por tipos distintos de linfocitos B. Aquellos antígenos no proteicos como lípidos, ácidos nucleicos y glicoproteínas estimulan la producción de anticuerpos en ausencia de la colaboración con las células T, razón por la cual se los denomina antígenos independientes del timo o TI. De manera inversa, la respuesta contra los antígenos proteicos requiere la colaboración de las células B y T, por lo que se conocen como antígenos dependientes del timo o TD.

Los antígenos TI se pueden subdividir en tipo I y tipo II. Los antígenos TI de tipo I son estímulos mitogénicos de la célula B e inducen la activación a través de TLRs; entre ellos se puede mencionar el lipopolisacárido (LPS), el oligonucleótido CpG o el ácido policitídílico (poli I:C). Tienen una capacidad intrínseca para producir la división de la célula B y activar tanto a células B inmaduras como a células B maduras. A altas concentraciones, estos antígenos inducen la proliferación y diferenciación de la mayoría de las células B independientemente de su especificidad, lo que se conoce como activación policlonal. En cambio, a bajas concentraciones pueden inducir respuestas de anticuerpos antígeno-específicas. Por otro lado, los TI de tipo II, son generalmente polisacáridos, que se unen al BCR e inducen respuestas específicas. Estos antígenos, por el contrario, sólo activan linfocitos B maduros específicos a través de su unión fuerte al BCR. A baja densidad del antígeno, la unión al BCR es insuficiente para generar la activación, mientras que, si la densidad es demasiado alta, la célula B entra en estado de anergia o ausencia de respuesta (Murphy y Weaver, 2016). Los anticuerpos generados contra los antígenos TI son generalmente de tipo IgM de baja afinidad comparados con los que se generan mediante la colaboración con las células T. Las células plasmáticas que se generan permanecen 2-3 semanas y luego la mayoría mueren, si bien algunas persisten y se ha observado la formación de células de memoria (Obukhanych y Nussenzweig, 2006).

Por otra parte, los antígenos proteicos o TD son reconocidos mayormente por linfocitos B FO y la activación se inicia mediante el reconocimiento a través del BCR y señales coestimuladoras críticas derivadas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos para ese mismo antígeno, lo que se denomina colaboración T-B. Una vez que el antígeno se une y es reconocido por el BCR, este receptor inicia una señalización hacia el interior del linfocito B que desencadena la expresión de genes esenciales. En una segunda instancia, el antígeno es internalizado por un proceso llamado endocitosis mediada por receptor, y dirigido a los compartimentos endosomales, donde es procesado y degradado en

pequeños péptidos que se unen a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHCII). Luego, los complejos péptido-MHCII se localizan en la superficie donde son reconocidos por las células T CD4<sup>+</sup>, iniciando la colaboración que permite la proliferación y diferenciación del linfocito B (Victoria y Nussenzweig, 2012). Esta interacción T-B tiene lugar en los OLS, donde las células son guiadas mediante la expresión de quimioquinas y sus respectivos ligandos (Okada *et al.*, 2005). El reconocimiento del péptido antigénico por el TCR del linfocito T CD4<sup>+</sup> induce en este último la expresión de la molécula CD40L que reconoce a CD40 en la superficie del linfocito B y genera la segunda señal necesaria para la activación. Conjuntamente, el linfocito T CD4<sup>+</sup> secreta citoquinas como IL-4 e IL-21 que contribuyen también a la proliferación y diferenciación del linfocito B. Esta colaboración B-T ocurre en el borde del folículo primario en los OLS (Kerfoot *et al.*, 2011). Algunos de los linfocitos B activados, se dirigen a la médula del ganglio linfático y se diferencian a células plasmáticas extrafoliculares o linfocitos B de memoria temprana. Estos plasmocitos producen los primeros anticuerpos de la respuesta humoral que son de tipo IgM. Otros linfocitos, a partir del aumento de la expresión de Bcl6 (*B-cell lymphoma 6 protein*), migran desde el foco inicial de proliferación hacia el interior del folículo primario, donde son retenidos por la expresión de CCR7 (*C-C motif chemokine receptor 7*) y EB12 (*G protein-coupled receptor 183*), y proliferan de forma muy activa para formar el centro germinal, luego de aproximadamente una semana iniciada la estimulación antigénica. Estos linfocitos B proliferantes reciben el nombre de centroblastos, y junto con las células Tfh y las células dendríticas foliculares (CDF) forman la zona clara del centro germinal (Green y Cyster, 2012). En el centro germinal, la citoquina IL-21 junto con señales co-estimuladoras derivadas de las células Tfh permiten que ocurran dos procesos esenciales para el desarrollo de la respuesta humoral: la hipermutación somática y el cambio de isotipo (Shlomchik y Weisel, 2012). La hipermutación somática se genera por mutaciones puntuales en los fragmentos génicos que codifican para las regiones variables de las inmunoglobulinas y posterior selección por competencia, de aquellos clones que generen anticuerpos de más alta afinidad por el antígeno (Papavasiliou y Schatz, 2002). El cambio de isotipo consiste en el reemplazo de la porción constante de la cadena pesada por otra de una clase diferente, permitiendo la generación de anticuerpos con distintas funciones efectoras pero la misma especificidad (Chaudhuri y Alt, 2004). Los linfocitos que sobreviven a este proceso de selección dan lugar a dos tipos de células: los plasmablastos, que abandonan el centro germinal para completar su diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos de alta afinidad y los linfocitos B de memoria. Los

plasmablastos migran a la MO donde dan lugar a células plasmáticas de vida media corta o larga (Pape *et al.*, 2011).

### **1.2.7. Inmunidad mediada por los linfocitos B en la infección con *T. cruzi*.**

Los linfocitos B, y en particular los anticuerpos producidos frente a la infección con *T. cruzi* fueron los primeros componentes estudiados de la respuesta inmune desarrollada en el contexto de la Enfermedad de Chagas (Lelchuk *et al.*, 1970). La mayor parte del conocimiento actual acerca del rol de los linfocitos B en la enfermedad de Chagas proviene de modelos experimentales, siendo escasos los hallazgos en pacientes cursando esta infección.

La importancia de la respuesta humoral de anticuerpos en el control de la infección por *T. cruzi* se evidenció en el modelo murino por Kumar y Tarleton, (1998). Este trabajo demostró que los ratones depletados de linfocitos B ( $\mu\text{MT}^{-/-}$ ) son incapaces de controlar la parasitemia y sucumben a la infección durante la fase aguda de la enfermedad (Kumar y Tarleton, 1998). Adicionalmente, tal como evidencian diversos estudios en modelos experimentales, la fase aguda de la enfermedad está caracterizada por una potente activación de linfocitos B foliculares y extrafoliculares así como con la producción de anticuerpos inespecíficos que conduce a una esplenomegalia e hipergamaglobulinemia y un retraso en la respuesta humoral específica (Ortiz-Ortiz *et al.*, 1980, Minoprio *et al.*, 1988, Bermejo *et al.*, 2011). Un caso de infección accidental permitió confirmar este fenómeno en el contexto del cuadro agudo en humanos, evidenciándose una expansión de anticuerpos totales en plasma, inicialmente IgM e IgA, luego IgG. La especificidad de estos anticuerpos no estaba relacionada a antígenos de *T. cruzi* (Grauert *et al.*, 1993).

La producción de anticuerpos inespecíficos durante la fase aguda no permitiría la eliminación completa del parásito, conduciendo a la persistencia de la infección. Existen tres factores principales desarrollados por *T. cruzi* que explicarían esta respuesta deficiente de anticuerpos. El primer factor es la gran variabilidad de antígenos que expone el parásito en su superficie: proteínas como mucinas, TSs y MASPs, las cuales están codificadas por familias multigénicas altamente polimórficas. Esta gran diversidad retrasa la activación de clones de linfocitos B específicos, y de esta manera la producción de anticuerpos de alta afinidad con capacidad neutralizante (Pitcovsky *et al.*, 2002, Buscaglia *et al.*, 2006, Cardoso *et al.*, 2016). Además, se cree que la presencia de una alta diversidad de antígenos evitaría la respuesta de anticuerpos contra sitios catalíticos



presentes en moléculas de superficie claves para el parásito (Cardoso *et al.*, 2016). El segundo factor estaría relacionado con la disminución de células B inmaduras en la MO. Zuniga *et al.*, (2005) mostraron que ratones infectados con *T. cruzi* presentan una disminución de células CD19<sup>+</sup> totales en MO, y en particular de la subpoblación de células B inmaduras CD19<sup>+</sup>HSA<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup> (HSA: *heat stable antigen*) durante los primeros 15-20 días post-infección. Esta depleción de células B inmaduras ocurre como consecuencia de un aumento de la tasa de apoptosis frente a la infección, inducido por la secreción de un factor soluble producto de la vía de la ciclooxigenasa (Cox) por células mieloides CD11b<sup>+</sup> en la MO (Zuniga *et al.*, 2005). Por otro lado, otro estudio de los mismos autores evidenció que a diferencia de lo que ocurre en la MO, *T. cruzi* contribuye a la apoptosis de células B maduras en el bazo de ratones infectados a través de la vía clásica de muerte dependiente del receptor Fas y Fas ligando (FasR/FasL), afectando mayormente células B productoras de IgG específica contra el parásito (Zuniga *et al.*, 2002). Estos estudios sugieren que *T. cruzi* afectaría por un lado la población de linfocitos B inmaduros en la MO, limitando así la generación de células B maduras completamente funcionales en la periferia y, por otro lado, induciría de forma directa la muerte de células B específicas en la periferia, comprometiendo de esta manera la respuesta humoral específica (Zuniga *et al.*, 2005, Acosta Rodriguez *et al.*, 2007). El tercer factor consiste en la presencia de moléculas derivadas de *T. cruzi* que funcionan como mitógenos de los linfocitos B y que conducen a la activación policlonal e independiente de la colaboración con los linfocitos T. Entre estas moléculas se encuentran la glutamato deshidrogenasa (TcGDH) (Montes *et al.*, 2006), la prolina racemasa (Reina-San-Martin *et al.*, 2000) y la transialidasa (TS) (Gao *et al.*, 2002). Esta activación policlonal de las células B permitiría la rápida disminución de la parasitemia en las primeras etapas de la infección, a través de anticuerpos reactivos contra un amplio espectro de estructuras presentes en *T. cruzi* y en otros patógenos. No obstante, se postula que este mecanismo de respuesta no focalizada contribuiría a la evasión y supervivencia del parásito, promoviendo una expansión generalizada de la población B y disminuyendo la frecuencia de células B productoras de anticuerpos específicos (Acosta Rodriguez *et al.*, 2007).

Se cree que los anticuerpos tendrían un rol dual en la infección con *T. cruzi*, ya que por un lado cumplirían un rol protector en el control de la infección, mientras que por otro lado contribuirían en la aparición de alteraciones durante la fase crónica de la enfermedad. Esta observación se basa en el hecho de que los pacientes en la fase crónica de la enfermedad de Chagas producen anticuerpos capaces de reconocer proteínas propias del huésped. Estos hallazgos son la base de la hipótesis que propone que el daño

tisular observado en la fase crónica es consecuencia de una respuesta auto-reactiva desencadenada por *T. cruzi* (Bonney y Engman, 2015). En particular, se hallaron evidencias de mimetismo molecular entre moléculas del parásito y del huésped con la consecuente producción de anticuerpos autorreactivos con efectos patogénicos, por ejemplo entre la proteína B13 de *T. cruzi* y la proteína miosina humana, y las proteínas P ribosomales del parásito y los receptores beta adrenérgicos (Bergami *et al.*, 2001, Cunha-Neto *et al.*, 2011, Levy *et al.*, 2011). Asimismo, diversos estudios mostraron evidencias que coinciden con muchos de los criterios que permiten establecer que una enfermedad es de origen autoinmune (Rose y Bona, 1993): (i) la identificación de antígenos de células T con reactividad cruzada, con la capacidad de reproducir por transferencia pasiva en el modelo murino, los cambios patológicos observados durante la infección; (ii) la disminución de la inflamación como consecuencia de la inducción de tolerancia a antígenos de origen cardíaco; y (iii) la inducción de autorreactividad y disfunción orgánica luego de la inmunización con *T. cruzi* o con antígenos cardíacos (Cunha-Neto E, 2011).

Debido a que los fenómenos de autorreactividad asociados a la infección con *T. cruzi* fueron detectados más frecuentemente en la fase crónica de la enfermedad en humanos y en modelos experimentales, algunos autores sugieren que estos anticuerpos se generarían como resultado de la estimulación débil pero prolongada en el tiempo de células B autorreactivas (Leon y Engman, 2001). Sin embargo, el hallazgo en fase aguda, de células autorreactivas y anticuerpos contra las proteínas miosina, actina y tubulina en ratones infectados así como anticuerpos contra lamina en pacientes, indicaría que este fenómeno se inicia de forma temprana durante el curso de la infección (Grauert *et al.*, 1993, Tibbetts *et al.*, 1994, Leon y Engman, 2001). Si bien no se conocen en profundidad los mecanismos a través de los cuales son generados estos anticuerpos, se han propuesto diversos mecanismos responsables de la aparición de autorreactividad durante la infección con *T. cruzi*, entre los que se incluyen: (i) la exposición de las células del sistema inmune a una gran cantidad de antígenos del propio huésped, expuestos por el daño tisular mecánico causado por el parásito junto con un contexto inflamatorio apropiado que disminuiría el umbral de activación (lo que se denomina activación *bystander*), (ii) la activación policlonal de linfocitos B con la consecuente producción de anticuerpos autorreactivos, (iii) el mecanismo de mimetismo molecular, a través del cual las células T y B reconocen antígenos del parásito que comparten epitopes estructuralmente similares con moléculas del huésped (Cunha-Neto E, 2011, De Bona *et al.*, 2018).

Adicionalmente, es importante mencionar que a pesar de que la señalización a través de la molécula BAFF y su receptor (BAFF/BAFF-R) constituye un factor clave para

la sobrevida de las células B de sangre periférica (Moore *et al.*, 1999), en exceso, contribuye a la emergencia de linfocitos B autorreactivos y al desarrollo de alteraciones autoinmunes en modelos animales y en el humano (Batten *et al.*, 2000, Gross *et al.*, 2000, Zhang *et al.*, 2001). Por otra parte, el modelo de ratón transgénico para BAFF y el modelo de infección con *T. cruzi* tienen varias características en común, que incluyen la activación policlonal de linfocitos B, la producción de anticuerpos autorreactivos y el desarrollo de autoinmunidad (Mackay *et al.*, 1999). Se demostró que los niveles de BAFF aumentan en etapas tempranas de la infección de ratones con *T. cruzi* y persisten en el tiempo, siendo mayores durante el pico de parasitemia. A través del bloqueo de esta molécula, los autores observaron que está directamente involucrada en el control del número de células B maduras en los órganos linfoides y en los niveles de anticuerpos inespecíficos de isotipo IgM e IgG, y específicos de tipo IgM, así como en el desarrollo de anticuerpos autorreactivos (Bermejo *et al.*, 2010). Sin embargo, el desarrollo de la respuesta específica de tipo IgG y la parasitemia no dependen de los niveles de BAFF. Es decir que en el contexto de la infección, BAFF controlaría la activación policlonal de los linfocitos B y en parte la producción de anticuerpos autorreactivos, pero no afectaría la respuesta de memoria específica antiparasitaria.

Otra función relevante de los linfocitos B es la de modular la respuesta de las células T a través de la presentación antigénica, la expresión de moléculas co-estimuladoras/inhibitorias y la secreción de citoquinas. En este sentido, Cardillo *et al.*, (2007) demostraron que ratones deficientes en linfocitos B ( $\mu\text{MT}^{-/-}$ ) infectados con *T. cruzi*, muestran una reducción en el número de células T  $\text{CD8}^+$  y una alteración en las poblaciones de células T de memoria central y efectora, evidenciando la importancia de estas células en la inducción de la respuesta T de memoria específica durante la infección aguda. Más recientemente, otros autores mostraron que en ausencia de linfocitos B maduros, aumenta la frecuencia de células T productoras de TNF y como consecuencia, la concentración plasmática de esta citoquina, mientras que disminuyen las células T  $\text{IFN-}\gamma^+$  y regulatorias ( $\text{Foxp3}^+\text{IL-10}^+$  y  $\text{IL-17}^+$ ). Asimismo, las células T  $\text{CD4}^+$  activadas frente a la infección mostraron una expresión reducida de los receptores inhibitorios CTLA-4, PDL-1 y Lag-3. Todos estos efectos indican que la ausencia de células B en la infección con *T. cruzi* contribuiría a la activación de las células T  $\text{CD4}^+$  de forma no convencional y a un estado pro-inflamatorio exacerbado (Gorosito Serran *et al.*, 2017).

Además, se sabe que *T. cruzi* compromete la función moduladora de los linfocitos B sobre las células T, a través de la secreción de mediadores inflamatorios. Estudios en el modelo murino mostraron que frente a la infección con *T. cruzi*, las células B activadas

inducen la apoptosis y disminuyen la producción de IFN- $\gamma$  en las células T a través de la secreción de la lectina Galectina-1 (Gal-1) (Zuñiga *et al.*, 2001).

Un descubrimiento relevante en torno a la funcionalidad de las células B como moduladoras de la respuesta inmune frente a la infección, fue la capacidad de producir IL-17 incluso en cantidades mayores a las células Th17, consideradas hasta ese momento las principales productoras de esta citoquina (Bermejo *et al.*, 2013). Curiosamente, esta capacidad de las células B de secretar grandes cantidades de IL-17 se observó por primera vez en el modelo murino de infección con *T. cruzi*. Los autores mostraron que esta respuesta estaría asociada con la actividad enzimática de la TS de *T. cruzi* sobre el receptor CD45 expresado en la superficie de las células B, y dependería de una vía de señalización y un programa transcripcional alternativo al de las células Th17. En un intento de aproximación al contexto de la infección en humano, los mismos autores demostraron que células B provenientes de amígdala de donantes no infectados también secretan IL-17 al ser incubadas con tripomastigotes de *T. cruzi* (Bermejo *et al.*, 2013). Paralelamente, otro estudio mostró que en el modelo murino de infección con *T. cruzi*, IL-17 induce el reclutamiento de neutrófilos productores de IL-10, que modularían la producción de IFN- $\gamma$ , limitando el daño tisular (Boari *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren un rol protector para la IL-17 secretada por las células B en la resolución de la infección.

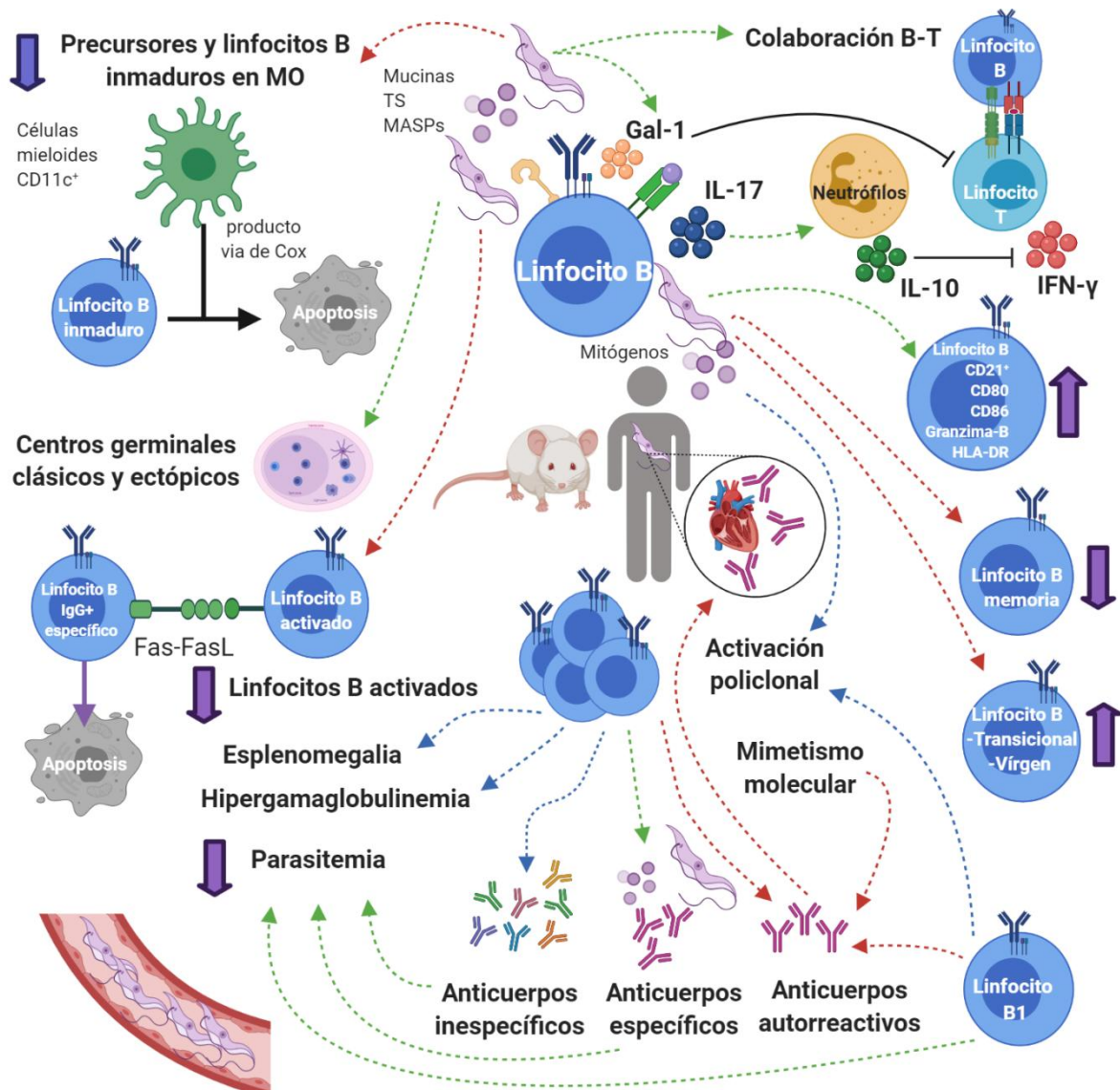
En cuanto a la funcionalidad de los linfocitos B1 en la infección con *T. cruzi*, los resultados obtenidos en el modelo murino sugieren que estarían involucrados en la progresión de la enfermedad. En un primer momento, la producción de anticuerpos autorreactivos fue atribuida a las células B1 CD5<sup>+</sup>, dado que se observó un aumento de esta población en el bazo de ratones infectados (Minoprio *et al.*, 1989). Posteriormente, ensayos en ratones BALB/c XID (*X-chromosome-linked immune-deficient*) portadores de una mutación que evita el desarrollo de los linfocitos B1 (carecen de linfocitos B1 CD5<sup>+</sup>), mostraron una respuesta de linfocitos B deficiente frente a la infección con *T. cruzi*, y bajos niveles de anticuerpos tanto específicos como inespecíficos en suero (Minoprio *et al.*, 1991). No obstante, estos ratones fueron capaces de controlar la parasitemia y no desarrollaron patología en las etapas tempranas de la fase crónica, lo que los autores atribuyen a la ausencia de células B1 secretoras de IL-10 y a los altos niveles de IFN- $\gamma$ , más que a la ausencia de células B1 (Minoprio *et al.*, 1993). Por otra parte, Merino *et al.*, (2010) mostraron una disminución de las células CD19<sup>+</sup> peritoneales en ratones infectados con *T. cruzi*, lo que asociaron a un aumento de la diferenciación a células

plasmáticas (CD19<sup>low/-</sup>). A pesar de su baja frecuencia, las células peritoneales mostraron una elevada secreción de anticuerpos de todos los isotipos en comparación con las células presentes en los nódulos linfáticos, en el bazo y en la MO, aunque la mayoría de estos anticuerpos resultaron inespecíficos contra *T. cruzi*. Adicionalmente, los ratones infectados presentaron células plasmáticas atípicas en el peritoneo, negativas para Sindecin-1 y con una expresión reducida de FcγRIIIb; ambos marcadores asociados al fenotipo clásico de célula plasmática. Llamativamente, hallaron en estas células abundantes gránulos citoplasmáticos de Igs, por lo que se las denominó “*Mott-like cells*” (Merino *et al.*, 2010). Aunque no se conoce aún el rol específico de las células B1 en la infección con *T. cruzi*, su asociación con manifestaciones autoinmunes en ratón y en humano sugiere que podrían estar relacionadas con las respuestas autorreactivas observadas en la Enfermedad de Chagas. Adicionalmente, un trabajo reciente mostró que los macrófagos provenientes de ratones BALB/c *wild type* son más susceptibles a la infección *in vitro* con *T. cruzi* que aquellos ratones carentes de linfocitos B1 (BALB/c XID); esta mayor susceptibilidad estaría dada por la producción de IL-10 por parte de estos linfocitos, que contribuiría a una menor producción de NO en los macrófagos (da Rocha *et al.*, 2019). Estos mismos autores mostraron también que las células B1-CDP son más susceptibles a la infección con *T. cruzi* que los macrófagos peritoneales, indicando que tanto las células B1 como las B1-CDP contribuirían a la persistencia del parásito en el huésped (da Rocha *et al.*, 2019). El conjunto de los resultados mencionados indica que la población de linfocitos B1 podría tener un rol detrimental en la Enfermedad de Chagas, aunque, por otro lado, podrían contribuir al control de la infección en etapas tempranas a través de la secreción de anticuerpos naturales no específicos de tipo IgM e IgG, disminuyendo rápidamente la parasitemia (Merino *et al.*, 2010, Amezcua Vesely *et al.*, 2012). En el contexto de la infección en humano, muy pocos trabajos exploran el rol de esta población. Se observó que los pacientes en la fase crónica de la enfermedad de Chagas tienen una mayor frecuencia de células B1 CD5<sup>+</sup> en sangre periférica (Dutra *et al.*, 1994, Sathler-Avelar *et al.*, 2003). Más recientemente, un estudio mostró que la estimulación de CMN con una fracción antigénica enriquecida en proteínas de *T. cruzi* conduce a un aumento en la frecuencia de linfocitos B1 (CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>) en aquellos pacientes sin manifestaciones clínicas, pero no en aquellos que presentan la forma cardíaca. Además, se observó una asociación entre una mayor frecuencia de células B1 CD11b<sup>+</sup> y una mejor función cardíaca en los pacientes. Asimismo, la fracción B1 CD11b<sup>+</sup> luego de la estimulación muestra una expresión balanceada de TNF conjuntamente con la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en los pacientes con la forma

indeterminada. Por el contrario, esta población en los pacientes con alteraciones cardíacas muestra un balance de citoquinas pro-inflamatorio luego de la activación (Passos *et al.*, 2019). Estos hallazgos en conjunto, a diferencia de lo que sugieren los estudios en el modelo murino, apuntan hacia un rol protector de los linfocitos B1 durante la infección crónica con *T. cruzi*.

Diversos estudios se enfocaron en evaluar los cambios generados por la infección crónica con *T. cruzi* en las poblaciones de linfocitos B de sangre periférica y la expresión de ciertos marcadores de superficie. En particular, se observó que los pacientes con CCC presentan una mayor frecuencia de linfocitos B totales (CD19<sup>+</sup>) y activados (CD19<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) en comparación con individuos no infectados (Piedras *et al.*, 1997). Este aumento de linfocitos B totales comenzaría en la fase aguda tardía y se haría más evidente al inicio de la fase crónica (Sathler-Avelar *et al.*, 2003). A diferencia de estos autores, Fares *et al.*, (2013) observaron la misma frecuencia de linfocitos CD19<sup>+</sup> en sangre periférica de pacientes con EChC y donantes no infectados, sin embargo, encontraron una mayor expresión de HLA-DR en las células B de los pacientes con la forma cardíaca y una mayor expresión de CD24 en aquellos pacientes con la forma sin manifestaciones clínicas. Adicionalmente, los mismos autores describen en las células B de ambos grupos de pacientes, una mayor expresión de CD21, molécula que funciona como co-receptor del BCR, de las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 asociadas con la activación de las células T, y de la enzima citolítica Granzima-B, relacionada con los procesos de apoptosis (Fares *et al.*, 2013). En particular, el aumento en la frecuencia de linfocitos B CD21<sup>+</sup> en los pacientes es hasta el momento una característica única de la infección con *T. cruzi*, debido a que en otras condiciones de estimulación crónica como HIV o malaria se observa una expansión de la subpoblación de linfocitos B CD21<sup>low/-</sup> (Thorarinsdottir *et al.*, 2015). Otros estudios evaluaron las alteraciones en diversas subpoblaciones dentro del compartimiento B de sangre periférica frente a la infección crónica con *T. cruzi*. Los resultados muestran que los pacientes con EChC presentan una disminución de la población B de memoria (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), comprendiendo las subpoblaciones IgM<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>, IgD<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>-</sup>IgG<sup>+</sup> y con cambio de isotipo (IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>), de precursoras (CD19<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) y células plasmáticas terminalmente diferenciadas (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>). Por el contrario, la frecuencia de la población de memoria doble negativa (CD19<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>) y CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>, que comprende a las poblaciones transicionales y maduras vírgenes se encuentra aumentada en los pacientes en comparación con los donantes no infectados (Fernández *et al.*, 2014). Los autores sugieren que la infección crónica con *T. cruzi* genera una constricción de la población B de

memoria CD27<sup>+</sup> de sangre periférica en distintos niveles del proceso de maduración, lo que podría explicar la respuesta de anticuerpos ineficiente contra el parásito que conduce a la persistencia. Cuando evaluaron los niveles de linfocitos B de memoria CD27<sup>+</sup> en relación a la forma clínica presentada por los pacientes en la fase crónica, evidenciaron una tendencia positiva para estas células a medida que se incrementa el compromiso cardíaco, sugiriendo que la contracción ocurre previamente a la aparición de sintomatología cardíaca y se revierte con el avance de la cardiopatía. Otro dato a destacar de este estudio es la asociación encontrada entre la cardiopatía chagásica y un nivel elevado de CD27 soluble en el plasma de estos pacientes, una molécula generada por el clivaje de CD27 presente en la membrana celular, y relacionada con la activación de las células T (Fernández *et al.*, 2014). En la **Figura 1.2.4** se resumen esquemáticamente los mecanismos que favorecen y perjudican a la inmunidad mediada por los linfocitos B en la infección con *T. cruzi*.



---

Figura 1.2.4: Principales mecanismos de la respuesta inmune adaptativa de linfocitos B involucrados en el control y la supervivencia de *T. cruzi* en el huésped. Los linfocitos B contribuyen en la respuesta contra *T. cruzi* mediante la secreción de anticuerpos específicos y no específicos, la secreción de citoquinas, la presentación antigénica y la colaboración con las células T. Sin embargo, *T. cruzi* afecta la inmunidad mediada por los linfocitos B en distintos niveles de desarrollo, ya sea alterando la frecuencia de células inmaduras y precursores en la MO como de células maduras vírgenes y de memoria en sangre periférica o de células activadas en el bazo. Los mecanismos que conducen a la activación policlonal constituyen la base de la disminución de la parasitemia en las primeras etapas de la infección, pero también la vía de escape a una respuesta específica y efectiva contra el parásito. Adicionalmente, el fenómeno de mimetismo molecular junto con la activación policlonal habilita la generación de anticuerpos autorreactivos que contribuyen al daño tisular. En el esquema se señalan con flechas verdes aquellos mecanismos que benefician al hospedador, con flechas rojas aquellos que permiten la evasión del parásito y con flechas azules los mecanismos que tienen efectos tanto beneficiosos como perjudiciales para el hospedador. Creado con BioRender.com.

---

### 1.3. Regulación de la respuesta inmune por los linfocitos B.

#### 1.3.1. Definición de los linfocitos B regulatorios.

El segundo gran componente de la regulación de la respuesta inmune luego de los linfocitos Treg, lo constituyen los linfocitos B regulatorios (Bregs) que serán tema central de esta Tesis. Durante las últimas décadas, ha crecido el interés en el estudio de esta nueva población de células B capaces de regular de forma negativa la respuesta inmune y mantener la homeostasis a través de la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, principalmente IL-10 y en menor medida TGF- $\beta$  e IL-35 (Rosser y Mauri, 2015). Debido a su capacidad inmunomodulatoria sobre la respuesta inmune se los denominó linfocitos Bregs (Bouaziz *et al.*, 2008, Mauri y Ehrenstein, 2008). La identificación e investigación de las células Bregs presenta cierta complejidad ya que no muestran actividad regulatoria *in situ*, y sólo pueden ser estudiadas luego de la estimulación *ex vivo* (Mauri y Menon, 2017). Además, la frecuencia de Bregs en CMN se encuentra aproximadamente dentro del 1-2%, lo que hace que sea aún más difícil estudiarlas (Yanaba *et al.*, 2008, Blair *et al.*, 2010).

Aunque el mecanismo más estudiado de la función regulatoria de estas células es la capacidad de producir IL-10, la citoquina con mayor efecto inhibitorio sobre la respuesta inmune, se encontraron mecanismos de regulación independientes de IL-10 en diversas patologías autoinmunes, tanto dependientes como independientes del contacto célula-célula, entre los que se destaca la participación de las moléculas PD-L1, ICAM, CD73, CD39, FasL, TGF- $\beta$  e IL-35 (Ray *et al.*, 2015). De todas maneras, IL-10 es considerada la marca funcional distintiva de esta población, conduciendo a que algunos autores hagan referencia a las Bregs como linfocitos B productores de IL-10 o células



B10 (Tedder, 2015). Esta denominación adquirió incluso más fuerza por el hecho que hasta el momento no se pudo hallar un marcador fenotípico o factor de transcripción único de esta subpoblación (Iwata *et al.*, 2011, Lykken *et al.*, 2015, Tedder, 2015). La importancia de IL-10 en el control de la respuesta inmune y la inflamación se demostró mediante el uso de animales *knockout* para el gen codificante de IL-10, los cuales mostraron reacciones graves o exacerbadas de colitis crónica, EAE y artritis. Sin embargo, no fue hasta la generación de animales quimera que pudieron identificar el rol de IL-10 producida específicamente por las células B. Estos ratones que carecían de IL-10 solamente en sus células B, presentaban niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias y de anticuerpos en circulación, confirmando su importancia en la regulación de la respuesta inmune (Carter *et al.*, 2012).

### **1.3.2. Factores de inducción involucrados en el desarrollo y la función de los linfocitos Breg.**

Los factores que inducen la generación de células Breg no están aun completamente dilucidados. Sin embargo, el incremento de esta población en diversos tipos de infección y patologías autoinmunes sostienen la idea de que las Bregs se inducen en contextos inflamatorios (Rosser y Mauri, 2015). Hasta el momento se sabe que, tanto en ratón como en humano, la inducción de la producción de IL-10 y diferenciación de las células Breg depende de la activación a través de ligandos de TLRs, agonistas del BCR y la interacción CD40-CD40L, ya sea a través del contacto con las células T o con CDs o proveniente de las propias células B (Yanaba *et al.*, 2009, Baba *et al.*, 2015, Mauri y Menon, 2017). Fillatreau *et al.*, (2008) propusieron un mecanismo en dos pasos para explicar la inducción de IL-10 en las células B, el cual comenzaría por la activación a través de los TLR y luego se reforzaría a través de la interacción del BCR y CD40, receptores típicamente involucrados en la maduración y expansión de las células B, con sus respectivos ligandos. Esta segunda señal permitiría incrementar la producción de IL-10 para una regulación efectiva (Fillatreau *et al.*, 2008). Adicionalmente, estudios posteriores demostraron que esta inducción aumenta con la interacción de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, la microbiota e interleuquinas como IFN- $\alpha/\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-21 (Mauri y Bosma, 2012, Baba *et al.*, 2015, Bankó *et al.*, 2017, Mauri y Menon, 2017). En el modelo murino, se comprobó tanto *in vivo* como *in vitro* que la molécula BAFF induce la generación de células B10 (Yang *et al.*, 2010). Análogamente, se confirmó en células B humanas estimuladas *in vitro*, que BAFF controla la producción de IL-10 a través

de su unión al receptor TACI (*transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor*) (Saulep-Easton *et al.*, 2016). Por otra parte, los estudios en humano en torno a la estimulación simultánea del BCR, TLR9 y/o CD40 muestran resultados contradictorios, mientras que algunos proponen que ejercen un efecto sinérgico en la producción de IL-10 (Bouaziz *et al.*, 2010), otros postulan que la señalización a través del BCR inhibe el aumento de IL-10 frente a la estimulación con CpG o CD40L (Kalampokis *et al.*, 2013, Daien *et al.*, 2014, Bankó *et al.*, 2017, Lighaam *et al.*, 2018).

Sumado a esto, como propusieron Rieger y Bar-Or, (2008), la producción de IL-10 en las células B vírgenes funcionaría mayormente en la prevención de la respuesta inflamatoria autoinmune o mantenimiento de la homeostasis mientras que en las células B de memoria cumpliría un rol en la resolución de la respuesta inflamatoria exacerbada como mecanismo para evitar el daño excesivo (Rieger y Bar-Or, 2008) (Figura 1.3.1). En conclusión, aunque no se caracterizaron de manera inequívoca las señales que conducen a la maduración y activación de las células Bregs, se sabe que comprenden señales exógenas o de agentes inflamatorios y señales endógenas, y depende tanto del contexto de activación como del subtipo de célula B involucrada (Vitale *et al.*, 2010, Wortel y Heidt, 2017).

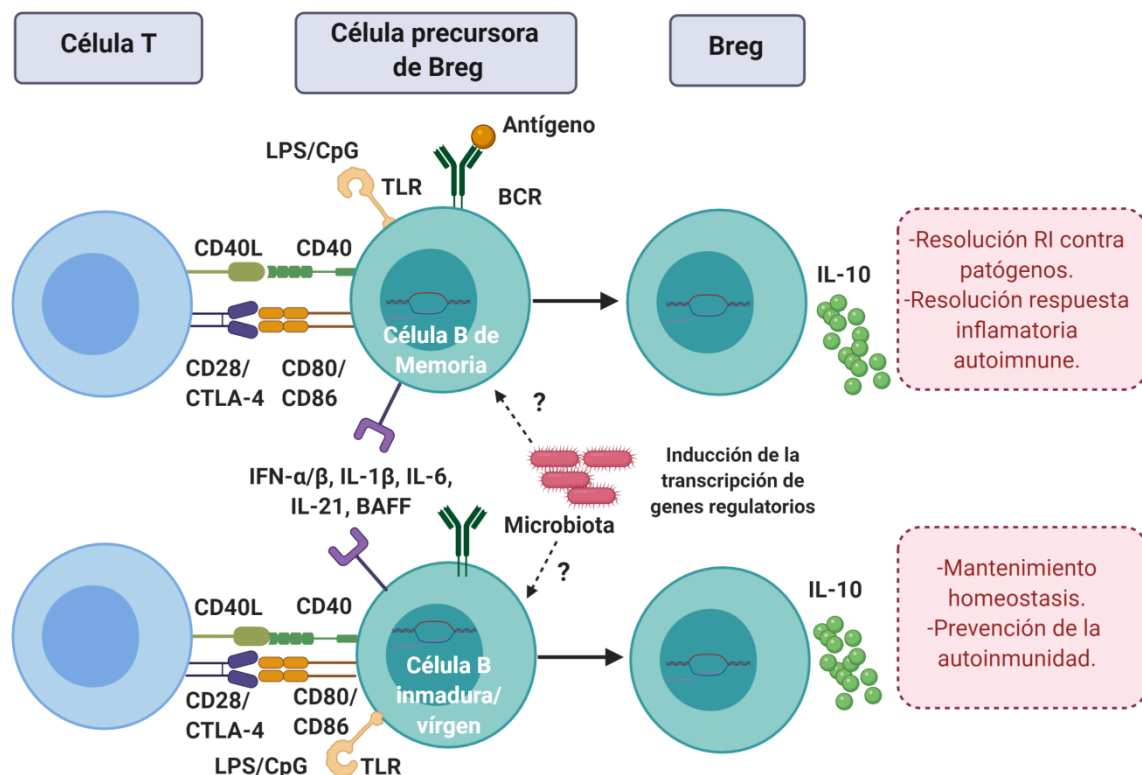


Figura 1.3.1: Mecanismos de inducción de las células Breg. Las células Breg se generan como consecuencia de la activación a través de señales exógenas inflamatorias que inducen el BCR y/o

---

TLRs, y de señales endógenas como la activación a través de moléculas co-estimuladoras (CD40L/CD28) o receptores inhibitorios provenientes de células T (CTLA-4). Adicionalmente, pueden inducirse por citoquinas (como BAFF e IL-21) y por componentes de la microbiota. Las células Breg de memoria y Breg inmaduras o vírgenes se diferenciarían a partir de distintos estímulos y cumplirían diferentes funciones en la regulación de la respuesta inmune (RI). Adaptado de Rieger y Bar-Or, (2008), Mauri y Menon, (2017). Creado con BioRender.com.

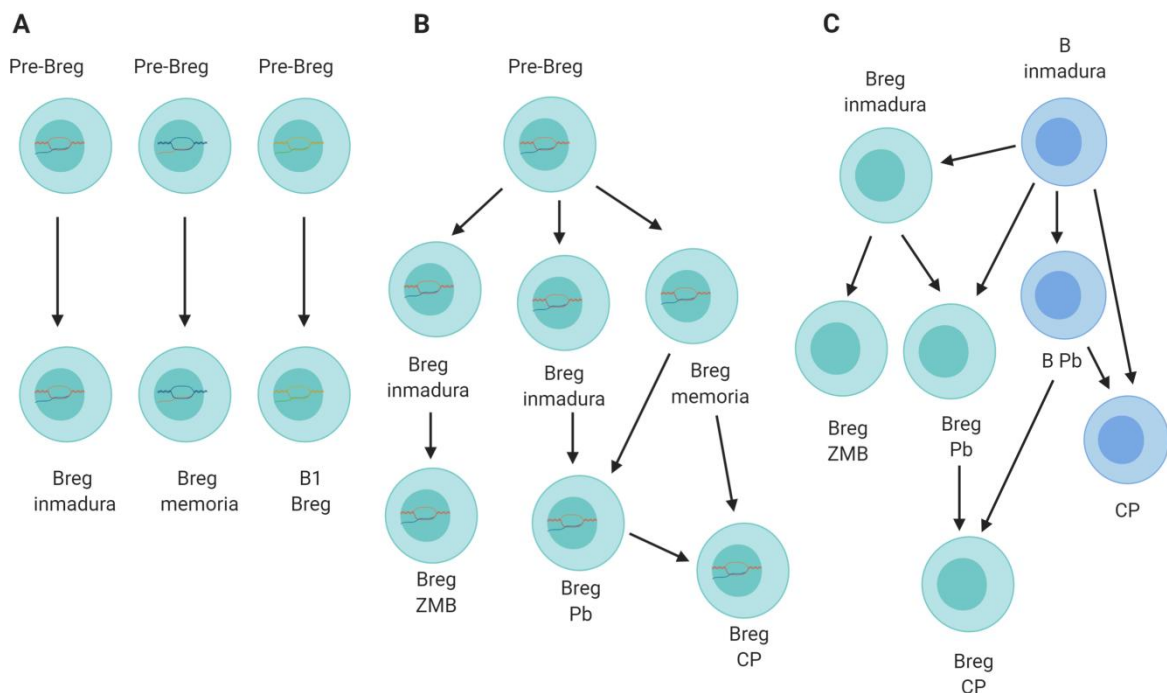
---

### 1.3.3. Identificación fenotípica y desarrollo de los linfocitos Breg.

La caracterización de las células Breg presenta cierta dificultad por varios factores. En primer lugar, que la IL-10 además de ser determinante en la capacidad supresora de estas células, también está involucrada en la maduración y la producción de anticuerpos en las células plasmáticas; en segundo lugar, que requieren de la activación a través de CD40L, otra molécula involucrada en la maduración y la producción de anticuerpos; en tercer lugar y el más importante, la ausencia de un factor de transcripción específico de diferenciación de Breg (Mauri y Bosma, 2012).

En las últimas décadas, en el intento de encontrar un marcador o conjunto de marcadores fenotípicos distintivos o *gold standard* para estudiar o aislar las células B10 en humano, se las ha descrito dentro de distintas subpoblaciones fenotípicas: CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> (Blair *et al.*, 2010, Siewe *et al.*, 2013), CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> (Iwata *et al.*, 2011, Das *et al.*, 2012, Jiao *et al.*, 2018), CD27<sup>int</sup>CD38<sup>+</sup> (Matsumoto *et al.*, 2014), CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup> (Zhang *et al.*, 2012, Karim y Wang, 2018), CD19<sup>+</sup>Tim-1<sup>+</sup> (Liu *et al.*, 2014, Aravena *et al.*, 2017, Gu *et al.*, 2017) y CD25<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup> (van de Veen *et al.*, 2013). Aunque casi todas las células B poseen la capacidad de producir IL-10, los estudios disponibles hasta el momento indican que las subpoblaciones fenotípicas en sangre periférica más enriquecidas en IL-10 son las CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (inmaduras transicionales) (Blair *et al.*, 2010), las CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (de memoria) (Iwata *et al.*, 2011) o ambas subpoblaciones (Bouaziz *et al.*, 2010). Las discrepancias en los fenotipos asociados a las células Breg están directamente relacionadas con el contexto de la patología en estudio y los distintos métodos de inducción (Mauri y Bosma, 2012). En este contexto complejo, se proponen tres modelos o hipótesis para explicar el desarrollo de las células Breg (**Figura 1.3.2**). El primer modelo, denominado de los linajes múltiples, postula que los distintos subtipos de células Bregs provienen de progenitores diferentes. El segundo modelo o del linaje único, propone que todos los tipos de células Breg descritas provienen de un único progenitor común, y su diferenciación depende de un factor de transcripción de linaje específico. Finalmente, el tercer modelo o de las Bregs

inducidas plantea que cualquier célula B puede convertirse en Breg y mostrar capacidad supresora ante determinados estímulos presentes en el ambiente (Mauri y Menon, 2015).



**Figura 1.3.2: Modelos de desarrollo de las células Breg.** (A) Modelo del linaje múltiple. (B) Modelo del linaje único. (C) Modelo de las Breg inducidas. Pre-Breg: célula precursora de Breg; ZMB: zona marginal del bazo; Pb: plasmablasto; CP: célula plasmática. Adaptado de Mauri y Menon, (2015). Creado con BioRender.com.

Un estudio de microarreglos de ARN realizado con el fin de caracterizar las marcas fenotípicas y transcripcionales de la población de células B10 humanas, mostró que sólo el 0,7 % del total de genes se encuentran diferencialmente expresados en las células B IL-10<sup>+</sup> con respecto a las IL-10<sup>-</sup> luego de la activación *in vitro* (Lin *et al.*, 2014). Además, pese a la activación del conjunto de la población B con CpG y un agonista del BCR, sólo el 15% fue capaz de producir IL-10. Asimismo, mostraron que si bien existen factores de transcripción expresados diferencialmente en las células B IL-10<sup>+</sup> en comparación con células B IL-10<sup>-</sup>, estos factores no son expresados únicamente por esta población, lo que sugiere que la producción de IL10 en las células B no estaría regulada por un programa genético “Breg específico” (Lin *et al.*, 2014). Un análisis realizado recientemente mediante la técnica de secuenciación masiva del ARN (RNA-seq) dio más soporte a la hipótesis de las Bregs inducidas, con posible implicancia de algunos factores de transcripción comunes, pero sin la existencia de un linaje Breg específico (Dubois *et al.*, 2020). Otro hallazgo interesante es que la producción de IL-10 en células Breg inducidas

en cultivo disminuye con el tiempo y la re-estimulación, lo que indicaría que no es un estado de diferenciación definitivo, sino transitorio (Lighaam *et al.*, 2018).

En función de dichos hallazgos, la hipótesis más aceptada actualmente es que estas células no provienen de un linaje específico de linfocitos B, como ocurre con las células Treg, sino que cualquier célula B, desde una célula B inmadura hasta una célula plasmática, podría potencialmente diferenciarse en una célula Breg en respuesta a ciertos estímulos del ambiente inmunológico, sin descartar la implicancia de algún programa transcripcional común (Mauri y Menon, 2015, Dubois *et al.*, 2020).

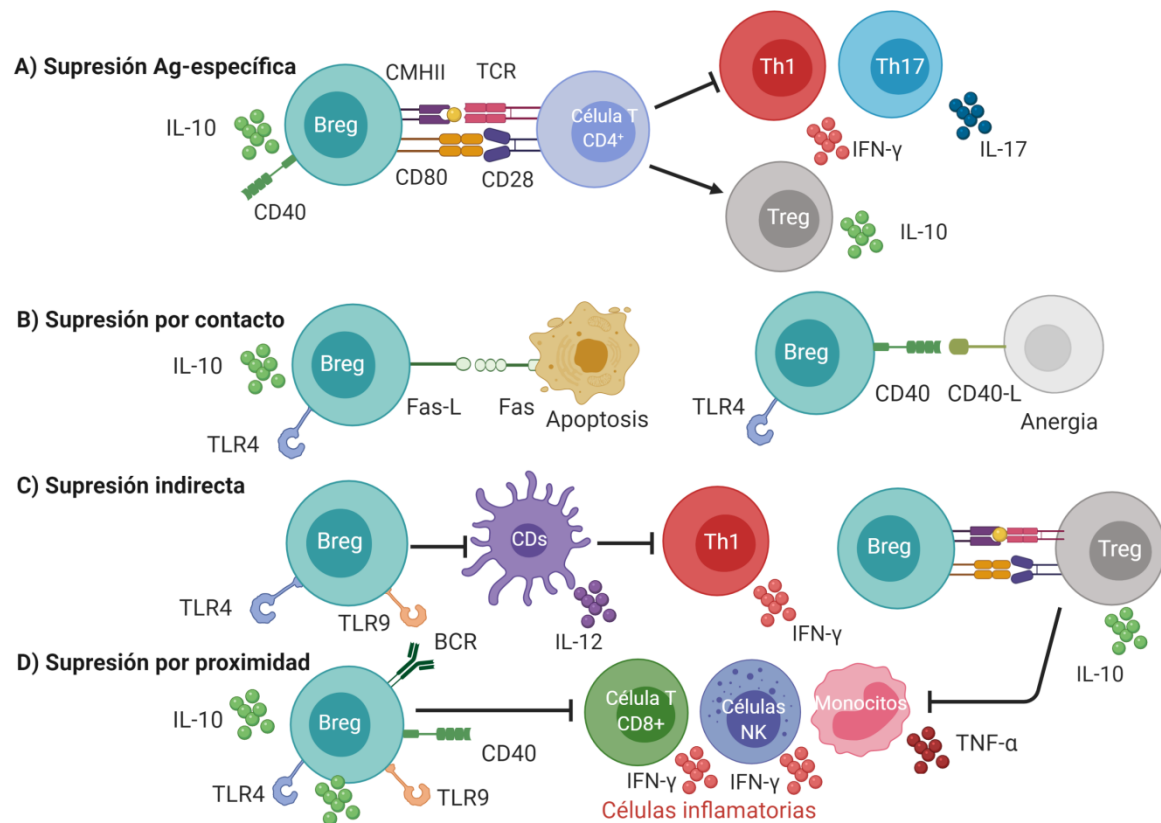
#### **1.3.4. Funcionalidad de los linfocitos Breg: mecanismos de supresión.**

Las células Breg constituyen una población heterogénea de supresores de la respuesta inmune con diversos roles en el mantenimiento de la homeostasis y la tolerancia inmune en condiciones normales y patológicas (Klinker y Lundy, 2012, Mauri y Bosma, 2012). Esta función puede ser patogénica o protectora dependiendo el contexto; por un lado, pueden suprimir los mecanismos inflamatorios que conducen al desarrollo de autoinmunidad, alergia o al rechazo de trasplantes, mientras que, por otro lado, pueden contribuir al ambiente tolerogénico asociado con el desarrollo de cáncer y con la persistencia de patógenos (Rosser *et al.*, 2014). La función regulatoria de las células B10 fue demostrada por primera vez por Mizoguchi *et al.*, (2002), en el modelo murino de enfermedad intestinal inflamatoria crónica (Mizoguchi *et al.*, 2002). Posteriormente, se comprobó la función inmunosupresora y se hallaron alteraciones en el número y/o la funcionalidad de esta población en diversas enfermedades autoinmunes (Blair *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2012, Flores-Borja *et al.*, 2013, Wilde *et al.*, 2013, Bankó *et al.*, 2017), alergia (van der Vlugt *et al.*, 2014), enfermedad de injerto-huésped (Furuzawa-Carballeda *et al.*, 2012, de Masson *et al.*, 2015), cáncer (He *et al.*, 2014), así como en enfermedades infecciosas (Siewe *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2016, Soares *et al.*, 2017). Adicionalmente, se hallaron asociaciones entre la función regulatoria de estas poblaciones y el avance clínico favorable de pacientes con enfermedades inflamatorias y autoinmunes crónicas (Fillatreau *et al.*, 2002, Blair *et al.*, 2010, Mauri y Bosma, 2012).

Los mecanismos de supresión de las células Bregs se pueden clasificar en cuatro tipos: supresión antígeno-específica (*cognate suppression*), a través del contacto célula-célula (*non-cognate suppression*), indirecta y por proximidad (*bystander*) (Rosser *et al.*, 2014) (**Figura 1.3.3**). La supresión antígeno-específica ocurre entre las células Breg y células T CD4<sup>+</sup>, esta mediada por la interacción entre antígenos externos presentados

por la célula Breg en el contexto del MHCII y el TCR en la célula T, y depende del contacto prolongado mediante la interacción de moléculas co-estimuladoras como CD80/CD86 y CD28. La supresión a través del contacto célula-célula difiere de la primera en que puede ocurrir con cualquier célula no relacionada o no específica para el mismo antígeno, y que depende solamente de la interacción entre receptor/ligando en las células Breg y las células blanco. La supresión indirecta de las Breg actúa como un efecto en cadena, inhibiendo o estimulando células que luego van a actuar sobre la funcionalidad de otras células, suprimiendo su actividad inflamatoria. Finalmente, la supresión por proximidad depende de la secreción de IL-10, y se genera sobre cualquier célula blanco cercana en el ambiente inflamatorio (Rosser *et al.*, 2014). Si bien existen mecanismos de supresión de las Breg independientes de la producción de IL-10, en esta Tesis se profundizará sólo en aquellos asociados a esta citoquina, aunque es importante tener en cuenta que aún aquellos que por definición se basan en otras moléculas, pueden ser potenciados o depender de la producción de IL-10, con lo cual no se descarta del todo su participación.

Las funciones inmunosupresoras de las células B10 descritas en humano son similares a las observadas en el modelo murino e incluyen la supresión de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y activación de células T, células dendríticas, monocitos y células NK (Iwata *et al.*, 2011, Lo-Man, 2011, van der Vlugt *et al.*, 2014, Andreani *et al.*, 2015), la inhibición de la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> (perfiles Th1 y Th17) y CD8<sup>+</sup> (Blair *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2012, Flores-Borja *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2014, Vlkova *et al.*, 2015, Bankó *et al.*, 2017) y la estimulación de células Treg (Bouaziz *et al.*, 2010, Gu *et al.*, 2017). Estos hallazgos demuestran el carácter pleiotrópico de la función reguladora de las células Breg.



**Figura 1.3.3: Mecanismos de supresión mediados por las células Breg.** (A) Supresión antígeno-específica. La interacción entre las células Breg con células T CD4<sup>+</sup> a través del MHCII presentando el antígeno y el TCR, puede conducir a la supresión de células T colaboradoras Th1 y Th17 y/o a la inducción de células Treg a través de la producción de IL-10. (B) Supresión por contacto célula-célula. La estimulación a través de TLR4 conduce a la producción de IL-10 por células Breg que expresan la molécula Fas-L o CD40 e interaccionan con células que expresan Fas o CD40L, induciendo la muerte celular o anergia. (C) Supresión indirecta. La estimulación a través de TLR4 y TLR9 de las Breg conduce a la producción de IL-10 y la inhibición de la producción de IL-12 en las CDs y consecuentemente, a la inhibición de la diferenciación y activación de células Th1. Las células Breg también pueden inducir la diferenciación de las células Treg, las cuales van a suprimir la activación de distintas células inflamatorias. (D) Supresión por proximidad. La estimulación del BCR, TLR4, TLR9 y CD40 conduce a la producción de IL-10 en las Bregs, lo que conduce a la supresión de distintas células inflamatorias. Algunos de estos mecanismos fueron comprobados tanto en el modelo murino como en el humano. Adaptado de Rosser *et al.*, (2014). Creado con BioRender.com.

### 1.3.5. Rol de los linfocitos Breg en enfermedades infecciosas.

El rol de las células Breg en enfermedades infecciosas se encuentra menos estudiado que aquel que ejercen en patologías autoinmunes (Dai *et al.*, 2017). Se sabe que la IL-10 tiene un rol dual en el contexto de las infecciones; por un lado, puede actuar protegiendo al huésped contra la inmunopatología mediada por una respuesta de tipo Th1 exacerbada, y por otro lado, ejercer un efecto de tolerancia frente a la respuesta contra patógenos, favoreciendo la persistencia (Couper *et al.*, 2008). De manera general,

se sabe que el incremento en la frecuencia de las células Bregs correlaciona de forma positiva con la carga bacteriana y viral, y se cree que puede contribuir a una respuesta débil a las vacunas (Garner-Spitzer *et al.*, 2013, Weinberg *et al.*, 2013).

En humano, dentro del estudio de las células Bregs en infecciones intracelulares destacan las infecciones virales: VIH, VHB (virus de la Hepatitis B) y VHC (virus de la Hepatitis C). Das *et al.*, (2012) fueron los primeros en demostrar en un análisis longitudinal en pacientes con CHB (infección crónica con VHB) que los niveles de IL-10 en el plasma y la frecuencia de células B10 se encuentran enriquecidos en correlación temporal con el pico de carga viral o inflamación hepática (Das *et al.*, 2012). A su vez, en ensayos *ex vivo*, mostraron que las células Breg a través de la producción de IL-10, suprimen las respuestas de las células T CD8<sup>+</sup> específicas y estarían implicadas en la patogénesis de la infección crónica con HVB. El análisis fenotípico de estas células demostró que pertenecen mayormente a la subpoblación de células B inmaduras transicionales (CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>) (Das *et al.*, 2012). Posteriormente, otro estudio mostró que los pacientes con CHB presentan en circulación una mayor frecuencia de células B10 y mayores niveles de IL-10 en el sobrenadante de cultivo de estas células en comparación con pacientes con la forma aguda de la infección (AHB) e individuos no infectados. A su vez, la frecuencia de células B10 correlaciona de forma positiva con la frecuencia de células Treg y de forma negativa con la frecuencia de células Th1 (CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), sugiriendo que estas células contribuirían con la respuesta inmune deficiente desarrollada en la infección crónica con VHB (Gong *et al.*, 2015). Por otra parte, en la infección con el VHC, un estudio reciente también mostró un aumento de la población Breg CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>, una correlación positiva de la frecuencia de estas células con la carga viral y con los niveles de marcadores de daño hepático, así como una disminución de las mismas frente al tratamiento con antivirales. Los autores sugieren que esta población estaría asociada con la persistencia viral y el daño hepático observado en los pacientes y las proponen además como potencial marcador de eficacia terapéutica (Fang *et al.*, 2020).

En cuanto a la infección con el VIH, se sabe que IL-10 y PD-L1 juegan un rol preponderante en favorecer el desarrollo de una respuesta T antiviral efectora ineficiente o exhausta que conduce a la persistencia del virus y la progresión de la enfermedad (Dai *et al.*, 2017). La función supresora de las células Breg en la infección con el VIH está asociada con la prevalencia sistémica de ligandos de los TLRs y CD40L, ambos implicados en la activación de estas células. Esto se infiere a partir de experimentos *in vitro*, en los cuales la estimulación de TLR2, TLR9 y CD40L en las células Breg de



donantes no infectados condujo al incremento de la expresión de PD-L1 y a una mayor frecuencia de células positivas para IL-10 (Siewe *et al.*, 2013). Además, se observó que la depleción *in vitro* de la población Breg (CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>) del conjunto de las CMN de los pacientes VIH<sup>+</sup>, conduce a una mayor frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> con actividad citotóxica (CD107a<sup>+</sup>) específica y una mayor proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales y específicos frente a la estimulación con un pool de péptidos virales (Siewe *et al.*, 2013). Al igual que lo que ocurre en la infección con VHB, la actividad supresora de las Breg sobre las células T es parcialmente dependiente de IL-10 (Das *et al.*, 2012, Siewe *et al.*, 2013). Adicionalmente, si bien se observó una disminución en la frecuencia de células Breg en los individuos VIH<sup>+</sup> con respecto a los individuos no infectados, la frecuencia de células IL-10<sup>+</sup> dentro de la subpoblación CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> se incrementó luego de la estimulación *in vitro*. Asimismo, la frecuencia de células Breg correlacionó positivamente con la carga viral, la activación inmune (frecuencia de células HLA-DR<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) y el agotamiento de las células T (frecuencia de células CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>) (Das *et al.*, 2012). Otro estudio llevado a cabo por Liu *et al.*, (2014), también evaluó la contribución de las células Breg en la infección con el VIH, pero a diferencia de Siewe *et al.*, (2013), que tuvieron en cuenta a la población CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>, estos autores se enfocaron en el total de las células B productoras de IL-10 o B10 (CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>). Así, observaron que las B10 se encontraban mayormente dentro de la subpoblación CD19<sup>+</sup>Tim-1<sup>+</sup>. Los pacientes VIH<sup>+</sup> presentaron una mayor frecuencia de células B10 en sangre periférica, y al discriminar entre pacientes en distintos estadios clínicos encontraron que este aumento correlacionaba con la carga viral sólo en aquellos con infección temprana pero no en los que cursaban con infección crónica, lo que indicaría que las células B10 se inducen en las primeras fases de la infección. Al estudiar la funcionalidad *in vitro* de las células B10 Tim-1<sup>+</sup> de los pacientes, hallaron que tienen la capacidad de suprimir la respuesta específica de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y esta función depende parcialmente de la producción de IL-10 (Liu *et al.*, 2014). En conjunto, estos hallazgos destacan la contribución de las células Breg en la progresión de las infecciones virales, principalmente a través de facilitar la supervivencia del patógeno en el huésped, en general en etapas tempranas de la infección, y empeorar las consecuencias de la enfermedad a través de la inhibición de la función efectora de las células T.

En la infección con *Mycobacterium tuberculosis*, los pacientes con la forma activa de la enfermedad muestran un aumento en la frecuencia de células Breg CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup> con una mayor actividad supresora que es capaz de inhibir la activación de células Th17 (Zhang *et al.*, 2012).

Se sabe que la prevalencia de enfermedades autoinmunes correlaciona inversamente con infecciones parasitarias y la evidencia sugiere que la infección con helmintos podría proteger contra la aparición de condiciones autoinmunes (Pineda *et al.*, 2012, Rodgers *et al.*, 2014). Una de las estrategias utilizadas por estos parásitos para evadir la respuesta inmune y generar cronicidad es promover el desarrollo de células Bregs, que indirectamente estarían ejerciendo un efecto protector sobre las condiciones de hiper-inflamación, a través de la supresión de la funcionalidad de células T efectoras. En este sentido, estudiar los factores liberados por estos helmintos para la inducción de las células Bregs se convirtió en una atractiva estrategia terapéutica, y un modo de comprender mejor los mecanismos de regulación en alergia y enfermedades autoinmunes (Finlay *et al.*, 2014).

A pesar de que existen pocas investigaciones relativas a la función de las células Breg en infecciones con parásitos protozoarios (intracelulares) como *T. cruzi*, las evidencias sugieren que esta población está implicada en el mantenimiento de la homeostasis inmune. Los modelos experimentales de infección con protozoarios muestran dos escenarios acerca de la función de las células Breg, una inducción en etapas tempranas de la infección que favorecería la persistencia de estos microorganismos en el huésped, o un rol inmunoregulador de estas células frente a la activación inmune generada por los parásitos, que evitaría el daño posterior. En la infección con *Toxoplasma gondii*, caracterizada por la inducción de una fuerte respuesta Th1 mediada por la producción de IFN- $\gamma$ , se demostró que las proteínas secretorias/excretorias derivadas del parásito (ESPs) durante la fase de lisis y liberación de taquizoítos en la fase aguda, inducen la diferenciación de células B vírgenes en células B10, caracterizadas por el fenotipo CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>high</sup>. Además, esta inducción estaría directamente asociada con la formación de los quistes de bradizoítos en cerebro durante la fase crónica de la enfermedad (Jeong *et al.*, 2016). De manera similar, la infección con el parásito intraeritrocítico del filo Apicomplexa, *Babesia microti*, induce la expansión de células Breg CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>high</sup> y el aumento de IL-10 en el plasma de los ratones infectados durante la fase aguda, y se cree que esta población estaría involucrada en la supervivencia del parásito y la susceptibilidad a la infección crónica (Jeong *et al.*, 2012). En cuanto a la Malaria, producida por la infección con un parásito protozoario del género *Plasmodium*, también perteneciente al filo Apicomplexa, se encontró un aumento de los niveles de BAFF en pacientes infectados (Nduati *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta que este factor está implicado en la generación de células B10, es posible que esta población contribuya en el establecimiento del equilibrio parásito-huésped (Soares *et al.*, 2017). La relación

directa entre las células Breg y la Malaria sólo fue estudiada en el modelo experimental de Malaria cerebral causada por *Plasmodium berghei* ANKA. En este modelo, se mostró que las células Breg a través de la producción de IL-10 ejercen un rol protector, previniendo la acumulación de células NK y T CD8<sup>+</sup> inflamatorias, el daño cerebral y aumentando la supervivencia de los ratones infectados, aunque no tienen impacto sobre la parasitemia (Liu *et al.*, 2013). En particular, dentro de las infecciones producidas por parásitos de la familia *Trypanosomatidae*, se observó que la producción de IL-10 por parte de células Bregs CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>high</sup> es determinante para la susceptibilidad a la infección con *Leishmania major* en ratones BALB/c y la polarización hacia un perfil de respuesta Th2 (Ronet *et al.*, 2010). Esta modulación del balance Th1/Th2 también fue previamente reportado en ratones infectados con el helminto *S. mansoni* (Hernandez *et al.*, 1997). Asimismo, las células B de pacientes con leishmaniasis visceral frente a la incubación con amastigotes de *Leishmania infantum* mostraron una mayor capacidad para diferenciarse a células B10 e inhibir la activación, proliferación y secreción de citoquinas pro-inflamatorias de las células T CD4<sup>+</sup> en comparación con donantes no infectados (Andreani *et al.*, 2015). Es evidente que las interacciones entre las células Breg y los protozoarios patógenos no son extrapolables a diferentes especies, aun perteneciendo a grupos emparentados filogenéticamente. Un resumen del rol de las Bregs en las enfermedades infecciosas puede observarse en la **Figura 1.3.4**.

En el contexto de la infección con *T. cruzi*, se observó un aumento de la expresión de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF-β en las células B de sangre periférica de pacientes con EChC con respecto a donantes no infectados. Adicionalmente, las células B CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup>, uno de los fenotipos caracterizados como Breg, muestran mayor expresión de IL-10 en pacientes con enfermedad de Chagas crónica independientemente de la forma clínica, lo que sugiere que tendrían un rol general en el control o la patogénesis durante la infección (Fares *et al.*, 2013).

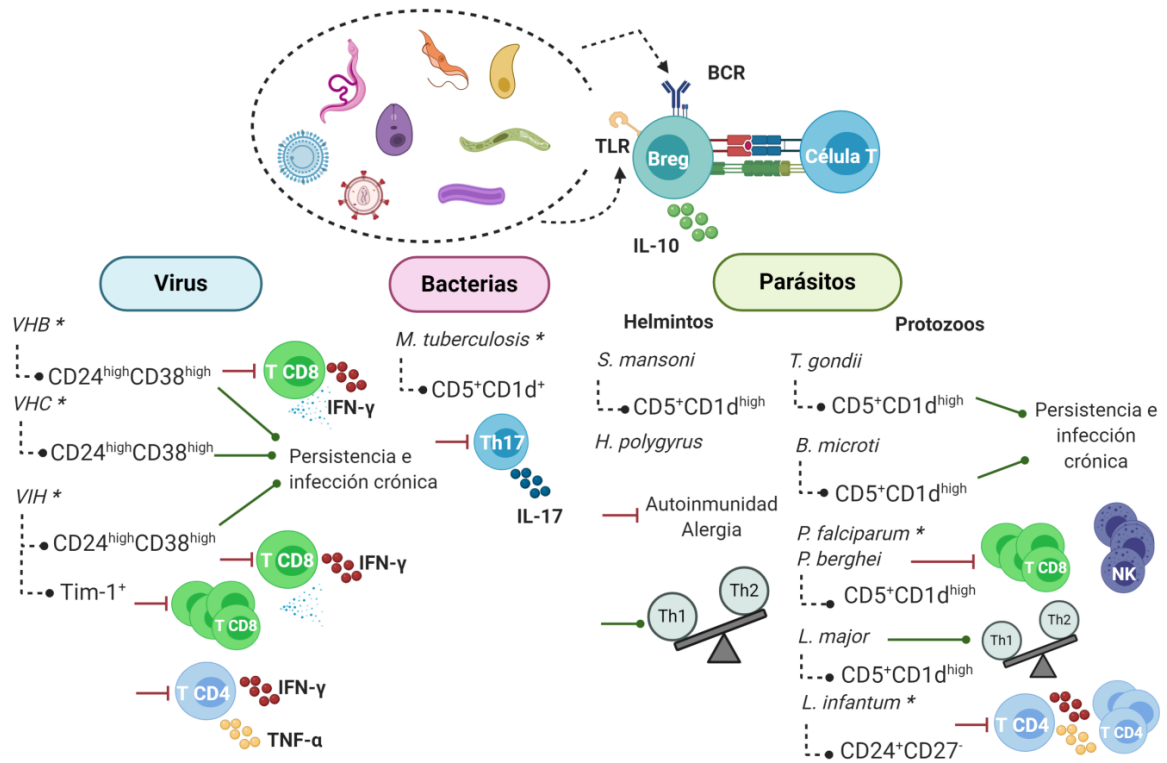


Figura 1.3.4: Las células Breg en enfermedades infecciosas. Esquema de los principales subtipos de Bregs hallados en la respuesta contra infecciones causadas por virus, bacterias o parásitos (helminthos o protozoos) y sus funciones inmunomodulatorias. Las funciones inhibitorias se esquematizan con señalador rojo y las estimulatorias en verde. Los patógenos señalados con un asterisco (\*) fueron estudiados en humano. Creado con BioRender.com.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos en esta Introducción y en particular:

- La importancia de la regulación de la respuesta inmune ejercida por las células B10 en diversas patologías infecciosas y autoinmunes en humano
- La presencia de un componente autorreactivo en la inmunopatología de la EChC
- La ausencia de estudios acerca del rol de las células B10 en la EChC

Se plantea la siguiente **hipótesis**: En los pacientes con enfermedad de Chagas crónica existen alteraciones en la frecuencia y/o distribución fenotípica de las células B y B10 que se asocian con la forma clínica presentada.

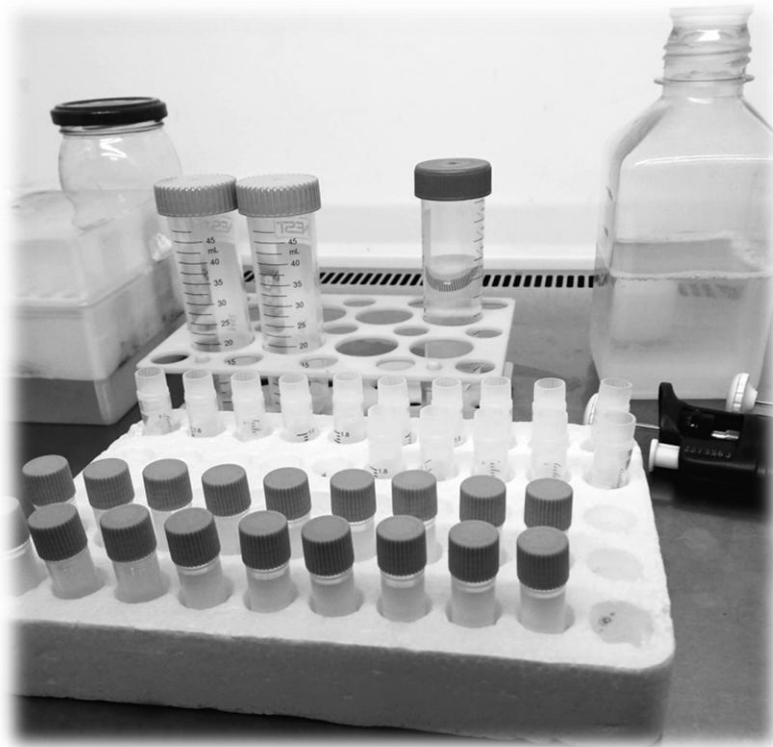
Para poner a prueba esta hipótesis el **objetivo general** de esta Tesis fue caracterizar a la población de células B y B10 de sangre periférica en pacientes con enfermedad de Chagas crónica y determinar si alteraciones existentes en estas células tienen una relación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Los **objetivos específicos** son:

- 1) Determinar la frecuencia y la distribución fenotípica *ex vivo* de las células B y B10 de sangre periférica en base a la expresión de los marcadores de membrana CD24, CD27 y CD38, en pacientes con las distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas crónica (con o sin alteraciones cardíacas) e individuos no infectados (controles).
- 2) Determinar la frecuencia y la distribución fenotípica *in vitro* de las células B y B10 de sangre periférica en base a la expresión de los marcadores de membrana CD24, CD27 y CD38, en pacientes con las distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas crónica (con o sin alteraciones cardíacas) e individuos no infectados (controles) frente al estímulo con lisado de *T. cruzi* y/o con el estímulo inespecífico con CpG+CD40L.
- 3) Estudiar la expresión de la molécula reguladora PD-L1 en las células B estimuladas *in vitro* de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica e individuos no infectados (controles).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

---



*"Cada experiencia tiene su elemento de magia". Hermann Hesse.*

## 2.1. Soluciones, medios de cultivo y reactivos generales.

**Solución de lisis de epimastigotes:**  $MgCl_2$  5 mM, acetato de Potasio ( $K^+CH_3COO^-$ ) 25 mM, DTT 1 mM, sacarosa 250 mM, Tritón X100 1% v/v, solución Tris-HCl 20 mM pH 7,4, cComplete (inhibidor de proteasas, Roche, Alemania) 1 tableta/10 ml.

**Solución de lisis de tripomastigotes:** EDTA 1 mM, Triton X100 0,1% v/v, NP40 (detergente no iónico) 0,1% v/v, NaCl 100 mM, PMSF (inhibidor de proteasas) 25 mM en  $H_2O$  destilada.

**TAE:** 4,84 g de Tris-Base; 1,034 ml de ácido acético glacial; 2 ml de EDTA 0,5 M; pH 8,0. Llevar a volumen con  $H_2O$  destilada.

**Solución de siembra de ADN 6X:** glicerina 60% v/v; azul de bromofenol 0,25% p/v; xilencianol 0,25% p/v en TAE.

**PBS:** NaCl 0,15 M,  $NaH_2PO_4$  2,5 mM,  $Na_2HPO_4$  7,5 mM; pH 7,4.

**PBS-Tween:** 0,05% v/v Tween-20 en PBS.

**Solución de Carbonato de Sodio:**  $Na_2CO_3$  15 mM,  $NaHCO_3$  35 mM, pH 9,6.

**Solución de citrato de Sodio:** citrato de Sodio (trisódico) 0,1 M, ácido cítrico 0,02 M, pH 5,5.

**Solución de sustrato TMB:** TMB (T8768- Sigma) 0,3% p/v, 72% v/v DMSO, 18% v/v glicerol, solución de citrato de sodio (0,1M, pH 5,5) 10% v/v.

**Solución de revelado de ELISA:** solución de citrato de Sodio 9% v/v, sustrato TMB 1% v/v,  $H_2O_2$  0,01% v/v.

**Medios RPMI-SFB/RPMI-SFB3:** Para todos estos medios se utilizó de base: RPMI 1640 (contiene HEPES y rojo fenol en su formulación comercial). Se adicionó bicarbonato de sodio 0,2% p/v y se esterilizó por filtrado al vacío. Luego se suplementó con L-glutamina 2 mM, Penicilina 100 U/ml, Estreptomina 100  $\mu$ g/ml. **RPMI-SFB:** + 10% v/v suero fetal bovino (SFB, Natocor, Córdoba, Argentina). **RPMI-SFB3:** + 3% v/v SFB.

**Medio LIT:** Infusión de hígado (*Liver Infusion*) 0,5% p/v, Triptona 0,5% p/v, NaCl 67,8 mM, KCl 5,3 mM,  $Na_2HPO_4$  22 mM, D-Glucosa 11,1 mM, SFB 10% v/v. Se esterilizó por autoclavado y se suplementó con Penicilina 100 U/ml, Estreptomina 100  $\mu$ g/ml y Hemina 10 mg/l.

**Medio de separación inmunomagnética de células B:** SFB 2% v/v en PBS, EDTA 1 mM estéril.

## 2.2. Reclutamiento de pacientes y toma de muestras.

La selección, el reclutamiento y la toma de muestras de sangre de pacientes con enfermedad de Chagas crónica fueron llevadas a cabo por el equipo médico de Cardiología del Instituto Nacional de Parasitología (INP-ANLIS) “Dr. Mario Fatała Chabén” y el Hospital de Agudos “Dr. Ignacio Pirovano”, ambos ubicados en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Los protocolos de investigación pertinentes fueron aprobados por el Comité de Ética de cada institución, previo al inicio de la investigación. De acuerdo con esto, todas las personas incluidas en el estudio cumplieron con el proceso del consentimiento informado previamente a la toma de las muestras.

Se consideraron como criterios de inclusión de los pacientes, poseer serología positiva para enfermedad de Chagas determinada por al menos dos métodos diagnósticos independientes, inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación indirecta (HAI) o ensayo de ELISA, y lugar de residencia dentro del AMBA (Área metropolitana de Buenos Aires; zona no endémica para la infección). Los criterios de exclusión fueron hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus, disfunción tiroidea, insuficiencia renal, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, desórdenes hidroelectrolíticos, alcoholismo, historial médico sugiriendo obstrucción coronaria arterial y enfermedad reumática, embarazo, tratamiento con Benznidazol y/o Nifurtimox, imposibilidad de completar los exámenes. Todos los pacientes incluidos fueron sometidos a examen clínico y cardiológico completo, incluyendo, a consideración de los médicos a cargo, evaluación de historia clínica, examen físico, electrocardiograma en reposo, exámenes de laboratorio de análisis clínico, radiografía de tórax y ecocardiograma. Teniendo en cuenta el examen clínico y cardiológico, los pacientes fueron estratificados de acuerdo a un criterio modificado de la clasificación de Kuschnir (Ribeiro *et al.*, 2012) y agrupados de acuerdo a la presencia ó ausencia de signos y/o síntomas cardíacos en:

**-Grupo 0 (G0):** pacientes sin signos ni síntomas de patología cardíaca demostrable (K0, radiografía de tórax y electrocardiograma normales).

**-Grupo 1 (G1):** pacientes con alteraciones cardíacas. Dentro de este grupo podemos distinguir tres subgrupos con distinto grado de severidad: K1, pacientes con alteraciones como bloqueo de rama derecha y/o izquierda y distinto grado de alteraciones funcionales



de la conductividad; K2, pacientes con dilatación del ventrículo izquierdo; K3, pacientes con insuficiencia cardíaca.

Como grupo control, se tomaron muestras de individuos no infectados con *T. cruzi* (**Grupo NI**), es decir con serología negativa, teniendo en cuenta los mismos criterios de exclusión. Se tuvo en cuenta que los individuos formando parte de cada grupo estén equilibrados en edad y en género. Las características clínicas y demográficas de los donantes se resumen en la **Tabla 2.1**. Una versión detallada de las características clínicas y demográficas de los pacientes puede consultarse en la sección **Apéndice, Tabla 7.1** y **Tabla 7.2**.

Las muestras consistieron en una toma de 50-80 ml de sangre venosa periférica colectada en tubos con anticoagulante EDTA (BD-Vacutainer). Una fracción de 3 ml de sangre completa se separó y se centrifugó durante 15 min a 800 g para la obtención del plasma, el cual se almacenó a -20°C hasta su utilización. Otra alícuota de 2 ml se separó para la detección de *T. cruzi* por qPCR (ver 2.4.2. Detección y cuantificación de *T. cruzi* en las muestras de sangre). El resto de la muestra se procesó para aislar las células mononucleares de sangre periférica (CMN) como se describe a continuación (ver 2.5. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica).

Tabla 2.1. Características clínicas y demográficas de los donantes.

Estudio con CMN ( <i>ex vivo</i> )			
Característica	NI (no infectados con <i>T. cruzi</i> , n=9)	G0 (pacientes sin alteraciones cardíacas, n=10)	G1 (pacientes con alteraciones cardíacas, n=10)
Edad, mediana (rango intercuartílico)	43 (36-60)	58 (51-61)	57 (52-64)
Género, F/M	6/3	5/5	6/4
Estadío Kuschner, 0-1-2-3	NA	10-0-0-0	0-8-1-1
PCR, +/-	NA	0/10	1/9
Título IgG anti- <i>T. cruzi</i> , mediana (rango intercuartílico)	<10	10.975 (1.496-39.013)	4.838 (1.194-19.145)
Estudio con células B aisladas ( <i>in vitro</i> )			
Característica	NI (no infectados con <i>T. cruzi</i> , n=13)	G0 (pacientes sin alteraciones cardíacas, n=13)	G1 (pacientes con alteraciones cardíacas, n=13)
Edad, mediana (rango intercuartílico)	42 (32-51)	54 (49-63)	56 (46-62)
Género, F/M	6/7	7/6	7/6
Estadío Kuschner, 0-1-2-3	NA	13-0-0-0	0-12-0-1
PCR, +/-	NA	6/7	5/8
Título IgG anti- <i>T. cruzi</i> , mediana (rango intercuartílico)	<10	2.135 (751-12.217)	6.084 (3.786-13.884)

El título de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* se determinó como el valor de la reactividad máxima 50 (RM<sub>50</sub>) de la curva de absorbancia en función del factor de dilución (ver 2.4.1. Determinación de IgG total contra *T. cruzi*). La determinación de DNA de *T. cruzi* en las muestras de sangre se realizó de acuerdo al protocolo descrito en la sección 2.4.2. Detección y cuantificación de *T. cruzi* en las muestras de sangre. Los pacientes incluidos en el estudio *ex vivo* corresponden a los ensayos sobre las CMN totales (ver 2.6 Estudio *ex vivo*), mientras que aquellos considerados en el estudio *in vitro* se refieren a los ensayos sobre las células B aisladas y estimuladas (ver 2.7 Estudio *in vitro*). NA: no aplica.

---

## **2.3. Lisado de *Trypanosoma cruzi*.**

**2.3.1. Lisado de epimastigote.** Se partió de un cultivo de 2 litros de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa CL Brener, UDT Tc VI) en medio LIT. Una vez alcanzada la fase exponencial del cultivo, se centrifugó a 400 g por 10 min en tubos cónicos de 50 ml. Luego de descartar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en PBS y se centrifugó nuevamente para lavar el medio de cultivo excedente. Este procedimiento de lavado se repitió 3 veces y en el último lavado se realizó un recuento de los parásitos totales en cámara de Neubauer. El sedimento resultante del último lavado se resuspendió en solución de lisis de epimastigotes, de acuerdo a la relación 0,5 ml de solución de lisis por cada 10<sup>9</sup> parásitos y se realizaron 5 ciclos de congelado en N<sub>2</sub> líquido y descongelado a temperatura ambiente. Las proteínas totales se cuantificaron por el método de Bradford, obteniéndose valores de concentración de 14 mg/ml. El lisado fue conservado a -80°C.

**2.3.2. Lisado de tripomastigote.** Partiendo de infecciones de células VERO con tripomastigotes (cepa CL Brener) con una multiplicidad de infección (MOI) 3:1 en medio RPMI-SFB3, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo a partir del día 4-6 post-infección, y se separaron los parásitos extracelulares por centrifugación. Este paso de separación consistió en una primera centrifugación a 400 g por 10 min para descartar los restos y detritos celulares, y una segunda centrifugación a 2.000 g durante 10 min para sedimentar los parásitos. El sedimento resultante se lavó con 1 ml de PBS y se contó el número total de parásitos en cámara de Neubauer. Finalmente, se centrifugó nuevamente a 2.000 g por 10 min, se descartó el sobrenadante y esos sedimentos secos se almacenaron a -20°C hasta coleccionar una cantidad total de 1x10<sup>8</sup> - 1x10<sup>9</sup> parásitos totales. El lisado de proteínas totales se realizó por resuspensión del sedimento seco en solución de lisis de tripomastigotes a razón de 50 µl por cada 10<sup>8</sup> parásitos. La suspensión resultante se sometió a 5 ciclos de congelado en N<sub>2</sub> líquido y descongelado a temperatura ambiente, y 3 ciclos de sonicado por 30 s cada vez. Finalmente, se centrifugó a 1.000 g por 5 min para remover los restos insolubles, y se cuantificaron las proteínas totales por

el método de Bradford, siendo el rendimiento aproximado de 4 mg/ml de proteína. Finalmente, se esterilizó por filtrado a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,2 µm de diámetro de poro y se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

## 2.4. Caracterización de las muestras de los pacientes.

**2.4.1. Determinación de IgG total contra *T. cruzi*.** El título de anticuerpos IgG totales anti- *T. cruzi* en el plasma de los pacientes y los donantes no infectados se determinó mediante un ensayo de ELISA *in house* previamente reportado (Girard *et al.*, 2018). Se insolubilizaron 20 µg/ml de proteínas de *T. cruzi* provenientes de lisado total (ver 2.3.1. Lisado de epimastigote) en 50 µl de solución de carbonato de sodio por pocillo en una placa de 96 pocillos Microlón de alta unión (GBO, Kremsmünster, Austria) durante toda la noche a 4°C. Luego de la incubación se descartó el lisado, se lavó 3 veces con PBS-Tween y se incubó con 150 µl por pocillo de solución de bloqueo (PBS-Tween conteniendo 5% de leche descremada) a 37°C durante 1 h. A continuación, se descartó la solución de bloqueo, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween y se colocaron 50 µl por pocillo de diluciones seriadas del plasma de los pacientes y de donantes no infectados en PBS-Tween con 1% de leche descremada; se realizaron 6 diluciones por duplicado para cada muestra. Se incubó por 2 h a 37°C, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween y finalmente los anticuerpos de tipo IgG unidos se detectaron con un anticuerpo de conejo anti-IgG humano acoplado a la enzima peroxidasa (HRP por sus siglas en inglés *HorseRadish Peroxidase*). La actividad enzimática se reveló con 50 µl por pocillo de solución de revelado de ELISA y se detuvo la reacción por el agregado de 25 µl por pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. Finalmente, se midió la absorbancia a 450 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro para microplacas (Molecular Devices, California, EE.UU.). El título de anticuerpos IgG de cada individuo se determinó como el factor de dilución del plasma que corresponde al 50% de la máxima respuesta o reactividad máxima 50 (RM<sub>50</sub>), calculada mediante un análisis de regresión no lineal de la curva obtenida de absorbancia en función del factor de dilución.

### 2.4.2. Detección y cuantificación de *T. cruzi* en las muestras de sangre.

**2.4.2.1. Extracción de ADN total de *T. cruzi*.** Para la detección y cuantificación de *T. cruzi* en las muestras de sangre de los pacientes se realizó la extracción del DNA total utilizando el kit de extracción comercial High Pure PCR Template Preparation kit (Roche

Diagnostics Corp., Indiana, EE.UU.), de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante. A continuación, se describe detalladamente el protocolo seguido: en un vial de 2 ml se agregaron 40 µl de proteinasa K, 200 µl de buffer de pegado, 200 µl de la muestra de sangre ya homogeneizada y 5 µl de control interno de amplificación (IAC) 100 pg/µl (Duffy *et al.*, 2013).

Se mezcló 15 seg en vortex y se incubó a 70°C durante 10 min en bloque térmico. Se añadió 100 µl de isopropanol, se homogeneizó en vortex y el volumen total se incorporó en su correspondiente columna High Pure Filter en un tubo colector de 2 ml. Luego de una centrifugación a 8.000 rpm durante 1 min, el tubo colector con el eluato se descartó, y la columna se colocó en un nuevo tubo colector. Se añadieron 500 µl de solución removedora de inhibidores y se centrifugó en las mismas condiciones descritas anteriormente, descartando el tubo con el eluato. Se repitieron dos etapas similares al paso anterior, pero con el agregado de 500 µl de solución de lavado. La columna se centrifugó a 13.800 rpm para la eliminación del etanol residual, se agregaron 100 µl de solución de elución precalentada a 70°C y se centrifugó a 8.000 rpm durante 1 min. El eluato obtenido se conservó a -20°C para su posterior análisis. La concentración de ADN se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm, y la pureza se determinó por la proporción DO 260 nm/280 nm y DO 230 nm/280 nm, utilizando el equipo Nanodrop1000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware).

**2.4.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).** En este trabajo la detección y cuantificación de *T. cruzi* se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por el grupo del Dr. Alejandro Schijman, LaBMeCh-INGEBI (Duffy *et al.*, 2013, Ramírez *et al.*, 2015), cuya secuencia blanco es el ADN satélite (ADNSat) de *T. cruzi* y del IAC en una misma reacción *duplex*. La reacción se realizó utilizando 5 µl del ADN en un volumen final de 20 µl de *FastStart Universal Probe Master Mix* (Roche Diagnostics GmbH Corp., Mannheim, Alemania). La amplificación se llevó a cabo en el equipo de PCR en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems, California, EE. UU) o Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Cambridgeshire, Reino Unido) con las siguientes condiciones de ciclado: 10 min de pre-incubación a 95°C, 40 ciclos de 95°C durante 15 seg y 63°C durante 1 min, con lectura de la señal de fluorescencia al final de cada ciclo. La detección y separación de los fragmentos amplificados por PCR, así como también la determinación de la integridad del ADN se realizó mediante corridas en geles de agarosa. El porcentaje de agarosa utilizado fue del 3%. Los geles se prepararon fundiendo la agarosa en el volumen correspondiente de TAE. La disolución de la misma se realizó por calentamiento en horno microondas y tras el enfriado parcial de la solución se agregó bromuro de etidio.

Previo a la siembra, las muestras de ADN se mezclaron con 0,2 volúmenes de solución de siembra 6X. La electroforesis se llevó a cabo en TAE, a voltaje constante (100-120 V), en cubas de electroforesis horizontales. Se utilizaron marcadores de tamaño de pares de bases (pb), y la corrida se visualizó en un transiluminador de emisión UV a 302 nm (Syngene). Las imágenes de los geles fueron guardadas en formato digital.

## **2.5. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.**

A partir de las muestras de sangre anticoagulada con EDTA, se aislaron las CMN por el método de centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Paque (GE-Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia), de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante. En todos los casos, el procesamiento de las muestras comenzó dentro de las 4 h posteriores a la extracción. A continuación, se detalla el protocolo empleado: se distribuyó la sangre correspondiente a cada donante en tubos cónicos de 50 ml y se diluyó al medio con PBS. La sangre diluida y homogeneizada previamente, se adicionó muy suavemente con pipeta serológica sobre una base de Ficoll-Paque en tubos cónicos de 50 ml en una relación de volúmenes 3:7 (Ficoll: sangre diluida). Se centrifugó a 400 g durante 40 min a temperatura ambiente sin aceleración ni freno. A continuación, se descartó de cada tubo la columna de Ficoll sobre la interfase de CMN y se colectaron estas células en otro tubo cónico de 50 ml. Las CMN obtenidas se diluyeron con PBS hasta un volumen final de 50 ml y se centrifugó a 400 g durante 10 min. Se descartó el sobrenadante por volcado y se re-suspendió las CMN en 1 ml de PBS. El número total de CMN aisladas se estableció por recuento en cámara de Neubauer con el agregado del colorante de exclusión Azul de Tripán para determinar la viabilidad. Finalmente, las CMN se centrifugaron nuevamente a 400 g 10 min y se descartó el sobrenadante con pipeta. Las CMN aisladas se re-suspendieron en suero fetal bovino (SFB, Natocor, Córdoba, Argentina) suplementado con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y se preservaron en N<sub>2</sub> líquido hasta su uso.

## **2.6. Estudio *ex vivo*.**

**2.6.1. Cultivo y estimulación de células mononucleares de sangre periférica.** Con el objetivo de evaluar la frecuencia y la distribución fenotípica de las células B y B10 *ex vivo*, a partir de CMN de pacientes con enfermedad de Chagas crónica (G0, G1) y donantes no infectados (NI) se evaluó la expresión de los marcadores CD24,

CD27 y CD38 dentro de la población B y B10, así como la expresión de IL-10 por marcación intracitoplasmática mediante citometría de flujo (ver 2.8. citometría de flujo).

Dado que las células B10 *ex vivo* se hallan en muy baja frecuencia en CMN de individuos sanos, diversos trabajos demostraron la necesidad de utilizar una estimulación a tiempos cortos con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA)/Ionomicina junto con el inhibidor del transporte de proteínas Brefeldina A (BFA) [PIB] para poder mejorar la detección de IL-10 de las mismas (Iwata *et al.*, 2011, Mauri y Menon, 2017). Con el propósito de corroborar dichos resultados en nuestra cohorte de pacientes e individuos no infectados, decidimos evaluar la frecuencia de las células B10 en condiciones basales sin estímulo (sólo medio de cultivo; SE) así como luego de la estimulación con PIB (2  $\mu$ l/ml *Cell stimulation cocktail* 500X: PMA 40,5  $\mu$ M- Ionomicina 670  $\mu$ M, eBiosciences, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU; BFA 5  $\mu$ g/ $\mu$ l (1  $\mu$ l/ml *Brefeldin A solution* 1000X Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU) (**Figura 2.1 A**). Los resultados evidenciaron valores de frecuencias muy bajas de células B10 en la condición SE (G0: 0,10 $\pm$ 0,12, G1: 0,08 $\pm$ 0,13, NI: 0,19 $\pm$ 0,30; mediana $\pm$  rango), mientras que en la condición de estímulo con PIB se observó una considerable mejora en la detección de células B10 tanto en los pacientes con EChC como en los individuos NI. En este sentido, la frecuencia de las células B10 aumentó en un orden de magnitud en los cultivos estimulados con PIB en comparación a los cultivos sin estímulo (SE vs. PIB, G0:  $p < 0,001$ , G1:  $p < 0,001$ , NI:  $p < 0,001$ ), y no se detectaron diferencias entre los grupos (**Figura 2.1 B**). En base a esta observación, se decidió utilizar la condición de estímulo con PIB para todo el análisis *ex vivo*.

Asimismo, como puesta a punto de la técnica y teniendo en cuenta la baja frecuencia de células B10 en sangre periférica en condiciones basales y la posibilidad de que el proceso de congelado en N<sub>2</sub> líquido afecte esta frecuencia, se evaluó la diferencia en el porcentaje de células B10 (CD20<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>) y de otras poblaciones IL-10<sup>+</sup> (CD20<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>) en muestras de CMN recién aisladas de sangre periférica y CMN criopreservadas en presencia de estímulo con PIB (**Figura 2.1 C**). Los resultados no mostraron diferencias significativas en la frecuencia de células B10 frente al estímulo con PIB en CMN recién aisladas y CMN congeladas en N<sub>2</sub> líquido. En cuanto al resto de las CMN, tampoco se observaron diferencias significativas en la frecuencia de células IL-10<sup>+</sup>, si bien se nota una tendencia a una disminución en las CMN criopreservadas (**Figura 2.1 D**).

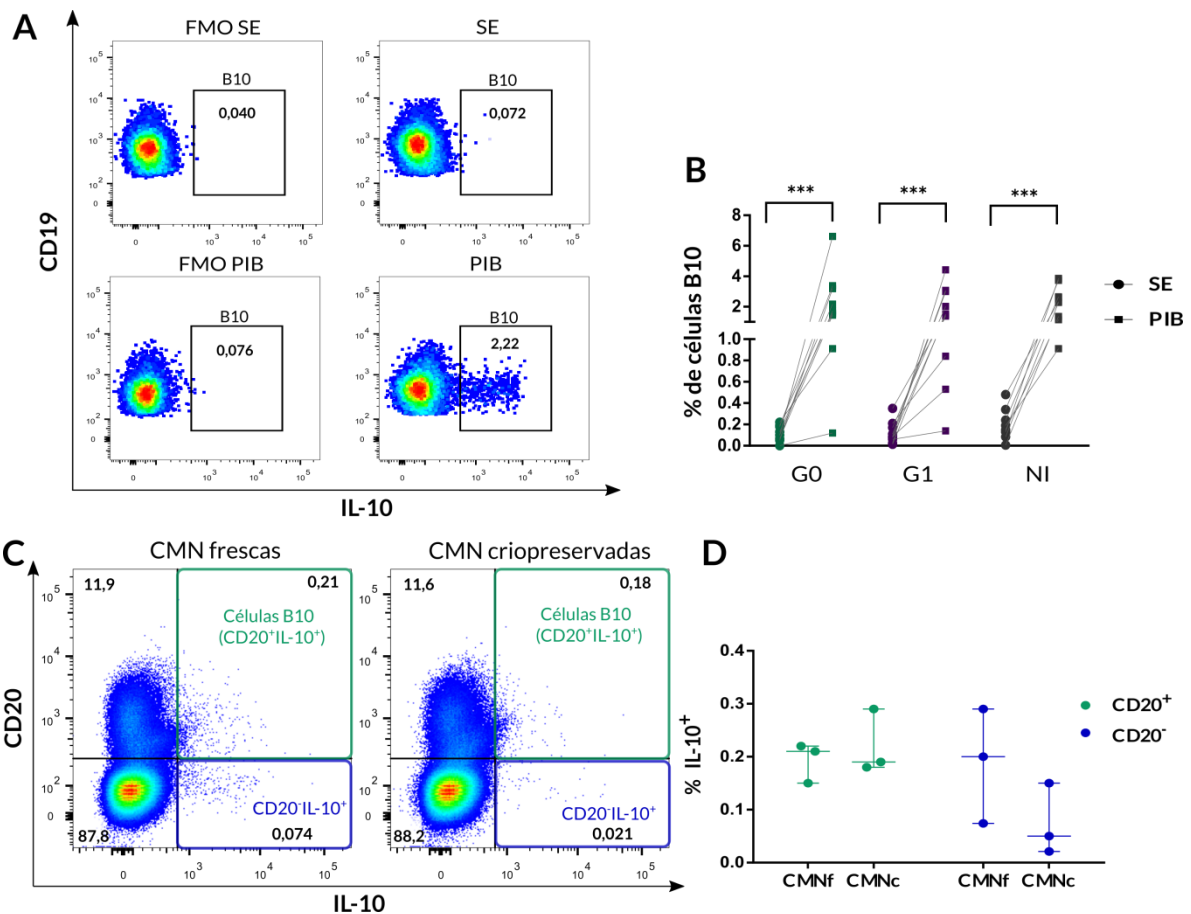


Figura 2.1. Frecuencia de células B10 *ex vivo* en CMN frescas o criopreservadas. **A)** Estrategia de análisis citométrico utilizada para determinar la población de células B10 (CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>) en las CMN sin estimular (SE) y estimuladas con PIB. Se muestran los gráficos correspondientes a un individuo no infectado (NI). Se emplearon controles FMO (*fluorescence minus one*) para determinar el punto de corte para las células IL-10<sup>+</sup> en cada condición. **B)** Frecuencia de células B10 en CMN sin estimular (SE) o estimuladas con PIB de pacientes con EChC e individuos NI. Cada punto representa el dato de un individuo. Las diferencias significativas se indican con asteriscos (\*\*\*)  $p < 0,001$ . **C)** Estrategia de análisis citométrico utilizada para determinar la población de células B10 (CD20<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>) y de otras poblaciones linfocitarias IL-10<sup>+</sup> (CD20<sup>-</sup>IL-10<sup>+</sup>) en CMN frescas y criopreservadas. Se muestran los datos correspondientes a un individuo NI representativo. **D)** Frecuencia de células IL-10<sup>+</sup> en las poblaciones B (CD20<sup>+</sup>) y en el resto de las CMN (CD20<sup>-</sup>) en muestras frescas (CMNf) o criopreservadas en N<sub>2</sub> líquido (CMNc) de individuos NI. La línea horizontal muestra la mediana de 3 individuos por condición y las barras indican el rango intercuartílico.

Una vez establecidas las condiciones del ensayo, las CMN criopreservadas se lavaron en RPMI-SFB por centrifugación a 400 g durante 10 min, se sembraron en una densidad de  $4 \times 10^6$  células/ml en placas de 48 pocillos (1 ml volumen final por pocillo) con medio RPMI-SFB y se mantuvieron en estufa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> y humedad controlada. Las células se dejaron en reposo y al día siguiente, se las incubó durante 5 h con PMA/Ionomicina junto con BFA (PIB). Finalmente, se realizó la marcación y la adquisición

en citómetro de flujo (ver 3.8.2. Marcación de moléculas de superficie y 3.8.3. Marcación intracitoplasmática).

## 2.7. Estudio *in vitro*.

**2.7.1. Aislamiento de células B.** A partir de las CMN, se aisló la población de linfocitos B mediante el kit de selección inmunomagnética negativa EasySep Human B cell Enrichment Kit (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) y el imán de separación EasySep Purple Magnet (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. Las CMN recién descongeladas en medio RPMI-SFB se lavaron por centrifugación en PBS a 400 g durante 10 min y se llevaron a una densidad de  $5 \times 10^7$  células/ml en medio de separación inmunomagnética en tubos de poliestireno de 5 ml. Se incubaron durante 10 min con la mezcla de anticuerpos (50  $\mu$ l/ml de muestra) y luego otros 10 min con la suspensión de esferas magnéticas (150  $\mu$ l/ml de muestra); ambos reactivos provistos por el kit. Seguidamente, se llevó a un volumen de 2,5 ml totales con medio de separación inmunomagnética y se incubó 5 min en el interior del imán. Finalmente, se invirtió el tubo contenido dentro del imán de manera que la solución se vertió sobre un nuevo tubo cónico, recuperándose así los linfocitos B. La suspensión de células se centrifugó para descartar el medio de separación, y luego de resuspender en RPMI-SFB, el número de células se contó en cámara de Neubauer. La población enriquecida en células B se caracterizó por citometría de flujo (ver sección Marcación de moléculas de superficie) para cuantificar el grado de recuperación y la pureza de cada muestra post-aislamiento, utilizándose los anticuerpos anti-CD3 acoplado a FITC y anti-CD19 acoplado a PECy5 (ver **Tabla 2.1**, en Anticuerpos y equipamiento). En la **Figura 2.2** se muestra un gráfico representativo de este análisis. La pureza media obtenida en las muestras post-aislamiento fue del  $91,65 \pm 4,58$  % (media  $\pm$  desvío estándar). Los datos del porcentaje de recuperación de células B para cada paciente pueden observarse en la sección **Apéndice, Tabla 7.3**. La pureza media obtenida refleja que el método de aislamiento seleccionado limita la posibilidad de que poblaciones contaminantes interfieran en los experimentos.



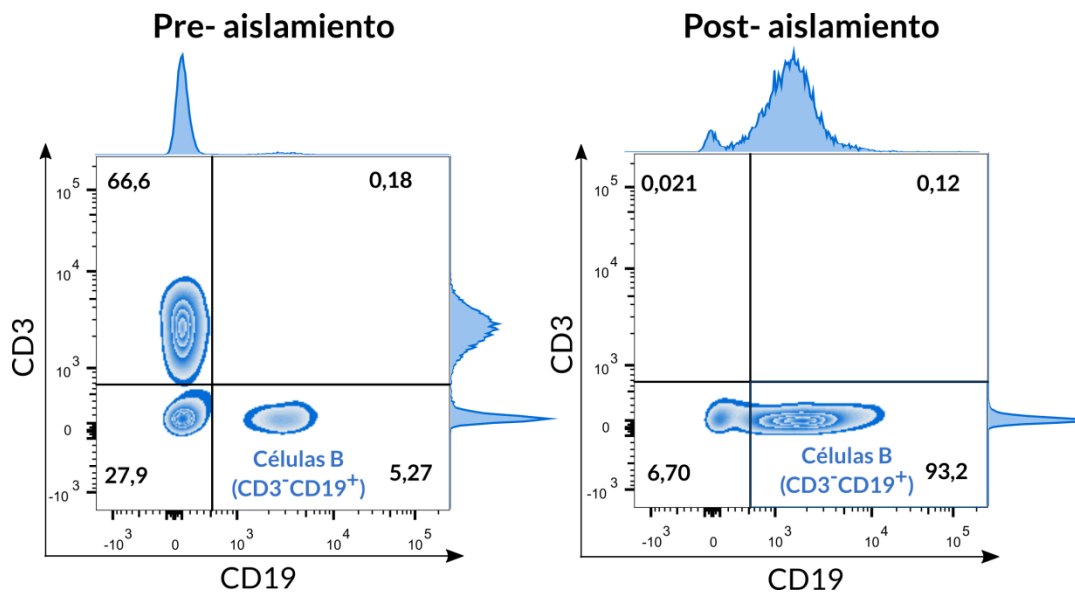


Figura 2.2. Análisis por citometría de flujo de la población de células B aislada por separación inmunomagnética a partir de CMN. Se muestra el esquema representativo de la eficiencia de recuperación de las células B de una muestra de CMN perteneciente a individuo NI antes y después del aislamiento. El análisis muestra los eventos dentro de la selección de linfocitos (FSC-A vs. SSC-A)/células individuales (FSC-A vs. FSC-H).

**2.7.2. Cultivo y estimulación de células B aisladas.** Para la caracterización de las poblaciones B y B10 *in vitro*, las células B recientemente aisladas por separación inmunomagnética se sembraron en una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml en RPMI-SFB en placas de 96 pocillos con fondo en U y se incubaron durante 48 hs en estufa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> y humedad controlada con: lisado de tripomastigote de *T. cruzi* (10 µg/ml), CpG (2,5 µg/ml; CpG ODN2006 humano 1,25 µM, InvivoGen, San Diego, USA; secuencia: 5'-tcgtcgtttgtcgtttgtcgtt-3') + CD40L (1 µg/ml; recombinant human CD40L, rhCD40L TNFSF5, Biolegend, San Diego, USA) [control positivo inespecífico] o CpG + CD40L + lisado de *T. cruzi*. Como control, se emplearon cultivos de células incubadas durante 48 hs sólo con medio de cultivo. A las 43 hs de cultivo se recuperaron los sobrenadantes para la determinación de citoquinas (ver 2.9. Cuantificación de citoquinas en sobrenadante), se les adicionó PIB y se incubaron 5 hs restantes para completar las 48 hs. Finalmente, las células se procesaron para el análisis por citometría de flujo (ver 3.8.2. Marcación de moléculas de superficie y 3.8.3. Marcación intracitoplasmática).

## 2.8. Citometría de Flujo.

**3.8.1. Anticuerpos y equipamiento.** Los anticuerpos y sus respectivos fluorocromos utilizados en los experimentos de citometría de flujo se detallan en la **Tabla 2.2**. Todos los anticuerpos empleados fueron previamente titulados para determinar la concentración a utilizar más apropiada.

La adquisición de las muestras procesadas para citometría de flujo se realizó en un citómetro BD FACS Cantoll o BD FACS Melody (BD Biosciences, San Diego, USA). Para el análisis de los datos se utilizó el programa FlowJo V10 (Treestar).

Tabla 2.2. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

Especificidad	Fluorocromo	Isotipo	Clon	Fabricante
CD3	BV421	Mouse IgG1 k	UCHT1	Biolegend
CD3	FITC	Mouse IgG1 k	SK7	BD Biosciences
CD4	PECy5	Mouse IgG1 k	RPA-T4	BD Biosciences
CD20	FITC	Mousse IgG2b k	2H7	BD Biosciences
CD19	PECy5	Mouse IgG1 k	HIB19	BD Biosciences
CD27	APC	Mouse IgG1 k	M-T271	Biolegend
CD24	PECy7	Mousse IgG2a k	ML5	Biolegend
CD38	APCCy7	Mouse IgG1 k	HB-7	Biolegend
IL-10	PE	Rat IgG1 k	JES3-9D7	Biolegend
PD-L1	FITC	Mouse IgG1 k	MIH1	BD Biosciences

Todos los anticuerpos fueron previamente titulados.

**2.8.2. Marcación de moléculas de superficie.** Una vez finalizada la estimulación en las condiciones detalladas previamente, las suspensiones celulares se transfirieron a una placa de 96 pocillos con fondo en V y se realizó un lavado con PBS para eliminar los restos de medio de cultivo por centrifugación a 700 g por 3 min a temperatura ambiente. Todas las centrifugaciones sucesivas se realizaron en estas mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante por volcado y se incubó el sedimento de células durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad con 25 µl por pocillo de solución de marcación. La solución de marcación consistió en diluciones apropiadas de los siguientes paneles de anticuerpos en sonda de viabilidad fijable 1X (Zombie-Aqua fixable viability kit, Biolegend, San Diego, USA): anti-CD3 BV421, anti-CD4 PECy5, anti-CD19 PECy5, anti-CD27 APC, anti-CD24 PECy7, anti-CD38 APCCy7 (para el panel de marcación *ex vivo*) o anti-CD3 BV421, anti-CD19 PECy5, anti-CD27 APC, anti CD24 PECy7, anti-CD38 APCCy7, anti-PDL-1 FITC (para el panel de marcación *in vitro*). En el caso de los controles de isotipo, se incubó con 25 µl de una solución conteniendo los

isotipos para cada anticuerpo del panel en PBS. Transcurrido el tiempo de la marcación de superficie, las células se lavaron con PBS por centrifugación, se descartó el sobrenadante y se fijaron durante 20 min en oscuridad con 75  $\mu$ l de solución de fijación (Fixation Buffer, Biolegend, San Diego, EE.UU.). Finalmente, se lavaron nuevamente por centrifugación en PBS, se descartó el sobrenadante y se procedió con el protocolo de marcación intracitoplasmática. En los casos en que sólo se requería marcación de superficie, las células fijadas se resuspendieron en 50-100  $\mu$ l de PBS y se conservaron a 4°C en oscuridad hasta el momento de la adquisición, que se realizó en todos los casos al día siguiente a la marcación de las células.

**2.8.3. Marcación intracitoplasmática.** Finalizada la marcación de superficie, luego de la fijación, las células se centrifugaron, se retiró el sobrenadante por pipeteo suave y se lavaron 2 veces por resuspensión y centrifugación (700 g por 3 min) en 50  $\mu$ l solución de permeabilización/lavado ("PWB", *Perm/Wash Buffer*, Biolegend, San Diego, EE.UU.). Luego de descartar el sobrenadante, las células se incubaron durante 30 min con 20  $\mu$ l de una dilución de anticuerpo anti-IL-10-PE en solución de PWB en oscuridad y a temperatura ambiente. Para realizar los controles FMO (*fluorescence minus one*), las células se incubaron con 20  $\mu$ l de PWB. Luego, se realizaron dos lavados sucesivos con 150  $\mu$ l de PWB y centrifugación en las mismas condiciones ya mencionadas. Las células se fijaron durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad con 75  $\mu$ l de solución de fijación, se lavaron una vez con PBS y se resuspendieron en 50  $\mu$ l de PBS para guardarse a 4°C en oscuridad hasta el momento de la adquisición en el citómetro.

**2.8.4. Análisis de citometría de flujo.** En todos los casos, el análisis de los eventos se realizó a partir de la población de linfocitos totales de acuerdo a los parámetros de dispersión frontal y lateral del láser (FSC-A vs. SSC-A) y seleccionando las células individuales (eventos en la diagonal de acuerdo a FSC-A (área) vs. FSC-H (altura)). Adicionalmente, se tuvo en cuenta sólo la población de células viables, descartando el resto mediante la detección de fluorescencia positiva en el canal de la sonda de viabilidad. Una descripción gráfica de la estrategia de análisis inicial para el procesamiento de las muestras en los ensayos *ex vivo* puede visualizarse en la **Figura 2.3**. Las poblaciones de linfocitos B, T y B10 se seleccionaron de acuerdo a la expresión de los marcadores CD3, CD19, CD4 e IL-10. Dentro de las células B y B10 se evaluaron las distintas subpoblaciones fenotípicas de acuerdo a la expresión de los marcadores CD24, CD27 y CD38 (la estrategia de análisis correspondiente se indica en cada Figura en el capítulo de *Resultados*). Se emplearon controles de isotipo para determinar las

poblaciones negativas para cada marcador. Las células IL-10<sup>+</sup> se determinaron en base a controles FMO para cada paciente.

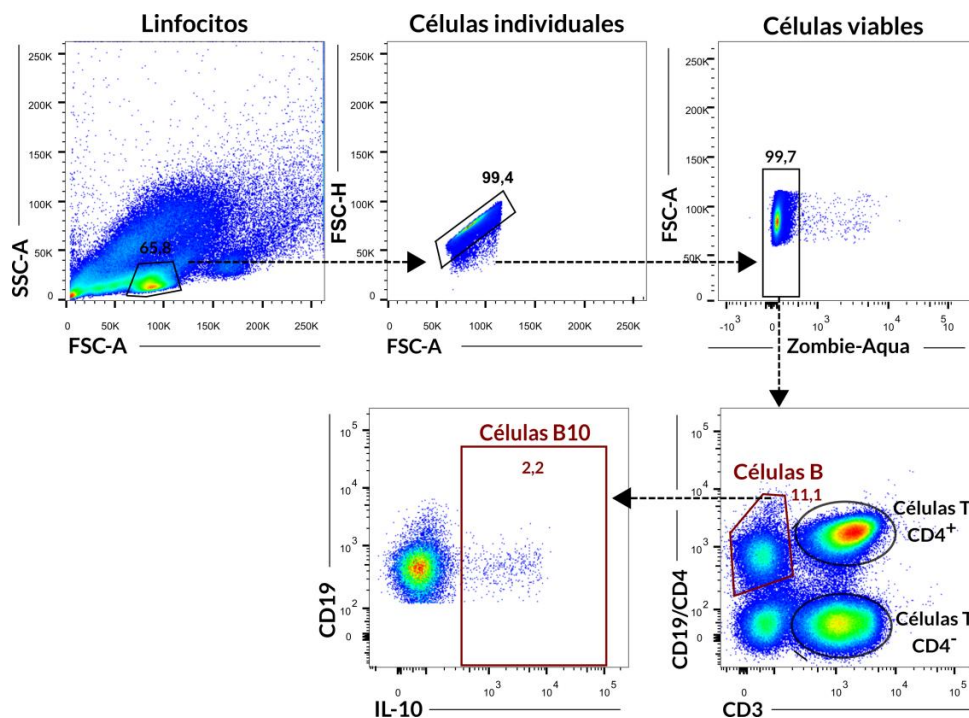


Figura 2.3. Estrategia general de análisis por citometría de flujo de las CMN en los ensayos *ex vivo*. Se muestra el esquema secuencial representativo correspondiente a un individuo NI de la estrategia de análisis inicial realizado para cada muestra. El análisis muestra los eventos dentro de la selección de linfocitos/células individuales/células viables. Posteriormente, se seleccionaron las células B (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) y T (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>). A partir de la selección de las células B se muestran las células B10 (CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>).

La estrategia de análisis de citometría utilizada en los ensayos *in vitro* consistió en la misma pre-selección (linfocitos, células individuales, células viables), para luego seleccionar las células positivas para CD19<sup>+</sup>, ya que pese a tratarse de células B aisladas, la pureza media de la muestra fue de alrededor del 90%, como se indicó previamente (Figura 2.4). Dentro de las células B, la determinación de las B10 se realizó mediante controles FMO para cada paciente; se eligió la condición de estímulo con *T. cruzi* para realizar el FMO. Los consecutivos análisis en base a los marcadores CD24, CD27 y CD38 se indican en cada Figura en la sección Resultados.

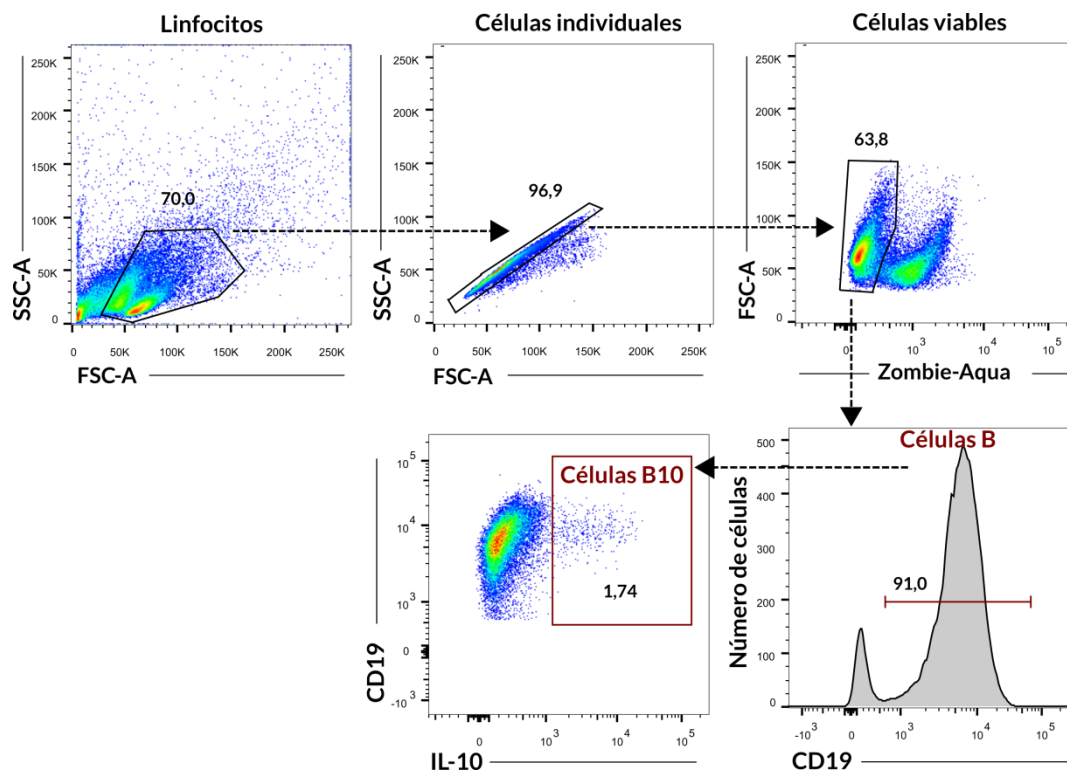


Figura 2.4. Estrategia de análisis por citometría de flujo de las células B aisladas en los ensayos *in vitro*. Esquema secuencial representativo correspondiente a un individuo NI de la estrategia de análisis inicial realizado para cada muestra. El análisis muestra los eventos dentro de la selección de linfocitos / células individuales / células viables. Posteriormente, se seleccionaron las células B (CD19<sup>+</sup>) y B10 (CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>).

## 2.9. Cuantificación de citoquinas en sobrenadante.

Los niveles de IL-10 e IL-17 se cuantificaron en el sobrenadante de cultivo de las células B luego de la incubación con los estímulos mencionados y antes del agregado de PIB. Se utilizaron ensayos de ELISA de captura comerciales (ELISA MAX Standard Set Human IL-10, Biolegend, San Diego, EE. UU.; Human IL-17A ELISA Ready-SET-Go! Affymetrix- Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.), y se siguió el protocolo según lo indicado por el fabricante.

Se preparó una dilución del anticuerpo de captura para la citoquina correspondiente en solución de carbonato de sodio de acuerdo a la concentración indicada y se adsorbió (colocando 50  $\mu$ l por pocillo) en placas de 96 pocillos Microlón de alta unión (GBO, Kremsmünster, Austria) durante toda la noche a 4°C. Una vez finalizada la incubación, se descartó la solución de anticuerpo de captura, se lavó 4 veces con solución de PBS-Tween, se escurrió el excedente y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con 100  $\mu$ l de solución de bloqueo conteniendo 10% de SFB en PBS.

Seguidamente, se descartó la solución de bloqueo, se lavó 5 veces con PBS-Tween y se colocaron 50 µl por pocillo de los correspondientes sobrenadantes de cultivo sin diluir o en una dilución 1:4 en RPMI-SFB según fuese necesario (12,5 µl de sobrenadante, 50 µl por pocillo volumen final) y 50 µl por pocillo de la solución correspondiente a la curva estándar de referencia por duplicado. La placa se incubó durante toda la noche a 4°C o durante 2 h a temperatura ambiente de acuerdo a los requerimientos de cada kit. Luego de descartar los sobrenadantes, la placa se lavó 4 veces con solución de PBS-Tween y se incubó con 50 µl por pocillo de una solución de anticuerpo de detección en la dilución recomendada en solución de bloqueo de ELISA durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se descartó el anticuerpo, se lavó nuevamente 4 veces con PBS-Tween y se incubó con Avidina-HRP en la concentración indicada en solución de bloqueo de ELISA durante 30 min a temperatura ambiente. Luego de eliminar la solución de Avidina-HRP, se lavó 5 veces a intervalos de 1 min con PBS-Tween, y se realizó el revelado con 50 µl por pocillo de solución de TMB provista por el kit durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción colorimétrica se detuvo mediante el agregado de 25 µl por pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. La lectura de absorbancia a una longitud de onda de 450 nm se realizó inmediatamente después, en un espectrofotómetro para microplacas (Molecular Devices, California, EE. UU.).

## 2.10. Análisis estadístico.

Para analizar las diferencias en la frecuencia y la intensidad de fluorescencia media (IFM) para los marcadores de las distintas poblaciones celulares entre los grupos en los ensayos *ex vivo*, se aplicó un modelo de regresión lineal (LM), que consistió en considerar el grupo como factor fijo y la frecuencia o la IFM como variable dependiente según cada caso. Se utilizaron comparaciones pos-hoc de Tukey HSD (*honest significant difference*) para comparar entre los grupos.

Para analizar las diferencias en la frecuencia e IFM de las distintas poblaciones celulares entre condiciones de estimulación y entre los grupos en los ensayos *in vitro* se aplicó un modelo de regresión lineal mixto (LMM), que consistió en considerar el grupo y la condición de estimulación como factores fijos, el individuo del cual provenía cada dato como factor aleatorio y la frecuencia o la IFM como variable dependiente. Se utilizaron comparaciones múltiples pos-hoc de Tukey HSD. Los datos provenientes de la cuantificación de citoquinas en sobrenadante mediante ELISA se analizaron de la misma

forma, utilizando un modelo de regresión lineal mixto, pero en este caso la variable dependiente consistió en la cantidad de citoquina detectada (pg/ml).

Los datos de frecuencia, IFM y cantidad de citoquina secretada se testearon en el cumplimiento de los supuestos en el contexto del modelo aplicado. Para evaluar si los residuos se ajustaban a una distribución normal se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Adicionalmente, se analizó si la varianza de los mismos era homogénea (homocedasticidad), mediante un gráfico de residuos en función de valores predichos. En los casos en los que la distribución de los residuos no fue normal, se realizó una transformación logarítmica de la variable implicada ( $\log_{10}$ ) previo al análisis estadístico.

En los casos en los que resultó de interés analizar la magnitud del cambio en el porcentaje de células o IFM se realizó de la siguiente manera: media del % de células o IFM en la condición con estímulo - media del % de células o IFM en la condición control / media del % de células o IFM en la condición control.

La correlación entre variables se realizó mediante la prueba no paramétrica de Spearman.

Todos los análisis estadísticos se realizaron en R, versión 4.0.2 (Team, 2013) con la función `lm`, `lmer` del paquete R `lme4` (Bates *et al.*, 2010) y `glht` del paquete `multcomp` (Hothorn *et al.*, 2014). Los p-valores menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

## 3. RESULTADOS

---



*“Creo que todos tenemos un poco de esa bella locura que nos mantiene andando cuando todo alrededor es tan insanamente cuerdo”. Julio Cortázar.*



### 3.1. Caracterización *ex vivo* de las células B y B10 presentes en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica.

Con el objetivo de caracterizar *ex vivo* la población de células Breg de sangre periférica en el contexto de la fase crónica de la enfermedad de Chagas, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD27, CD24 y CD38 en las células B totales (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) y en las células B10 (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>) presentes en CMN provenientes de pacientes con EChC sin alteraciones cardíacas (G0), con compromiso cardíaco (G1) y de individuos no infectados (NI, grupo control) (ver sección 2.6.1. Cultivo y estimulación de células mononucleares de sangre periférica).

En primera instancia, se evaluó el porcentaje de células B totales (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) en los grupos estudiados, observando un aumento de estas células en los pacientes con alteraciones cardíacas (G1) con respecto a los donantes no infectados (NI), ( $p=0,016$  **Figura 3.1.1 A**). En el caso de los pacientes del grupo G0, se observó una tendencia no significativa al aumento del porcentaje de células B con respecto al grupo control ( $p=0,098$ ). Por otro lado, no se observaron diferencias entre los grupos de pacientes con EChC (G0 vs. G1). Dado que la expresión de la molécula CD19 es importante en la proliferación y la supervivencia de las células B10 (Yanaba *et al.*, 2008), se evaluó la IFM para esta molécula en las células B de los individuos de los tres grupos. Los resultados mostraron que la IFM para CD19 es similar en las células B de los pacientes con EChC y en los individuos no infectados (**Figura 3.1.1 B**).

En sangre periférica humana, se pueden identificar 4 subpoblaciones de linfocitos B de acuerdo a los niveles de expresión de los marcadores CD24 y CD38: CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> (células B inmaduras transicionales), CD19<sup>+</sup>CD24<sup>int</sup>CD38<sup>int</sup> (mayormente células B vírgenes), CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>low</sup> (mayormente células B de memoria) y CD19<sup>+</sup>CD24<sup>low</sup>CD38<sup>high</sup> (plasmablastos) (Carsetti *et al.*, 2004, Sims *et al.*, 2005). Tal como se describió en el Capítulo *Introducción*, los estudios recientes indican que las subpoblaciones fenotípicas en sangre periférica en humano más enriquecidas en IL-10 son las CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (inmaduras transicionales), las CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> (de memoria) o ambas subpoblaciones. Teniendo en cuenta la estrategia de análisis ilustrada en la **Figura 3.1.1 C**, se evaluó la frecuencia de las subpoblaciones de células B de acuerdo a la expresión combinada de CD24 y CD38. Los resultados mostraron un aumento de la frecuencia de las células B transicionales (CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>) dentro del

total de las células B en los pacientes con alteraciones cardíacas con respecto a los individuos no infectados (G1 vs. NI,  $p=0,039$ , **Figura 3.1.1 D**). En relación a la frecuencia del resto de las células B, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos (**Figura 3.1.1 D**).

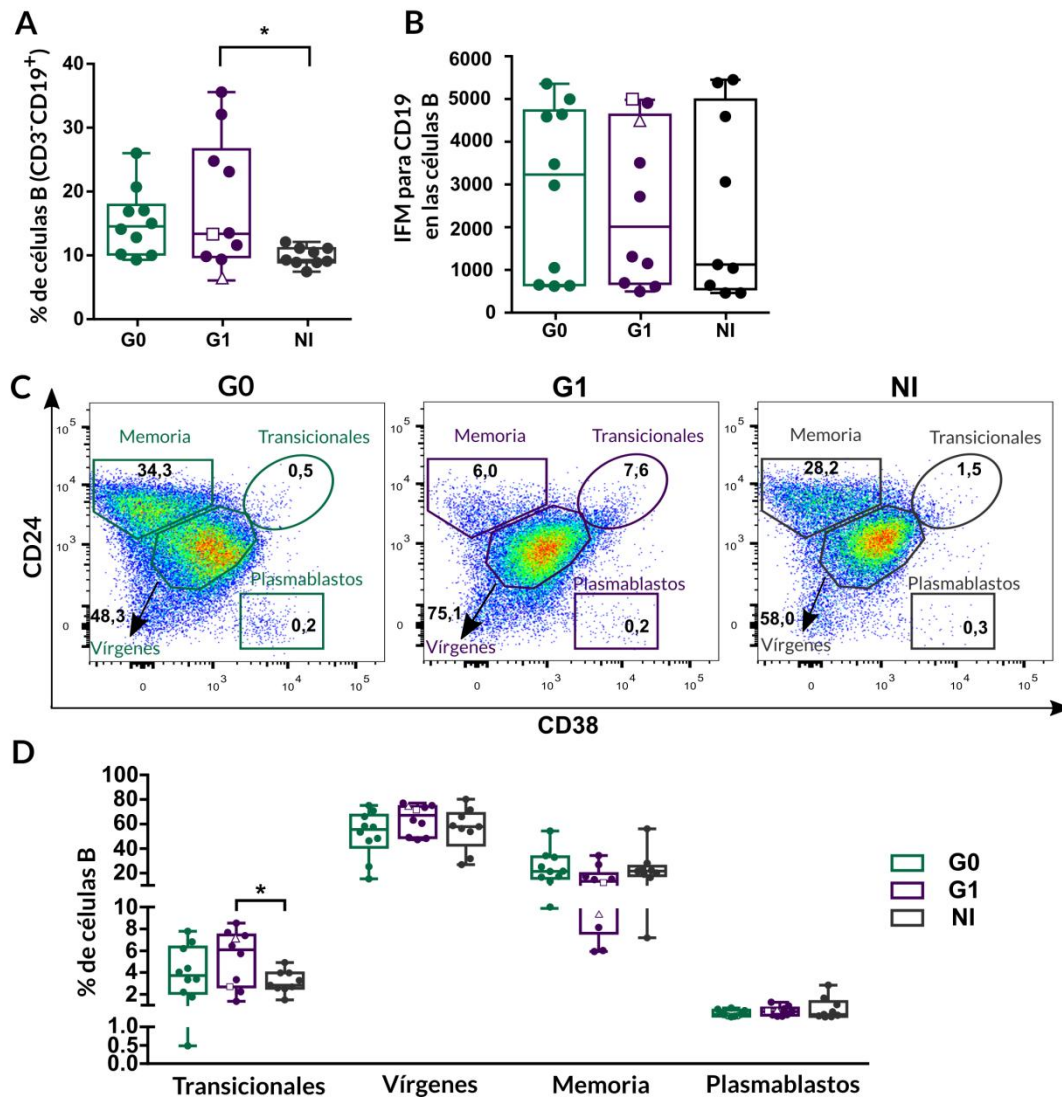


Figura 3.1.1. Frecuencia y distribución fenotípica *ex vivo* de células B de acuerdo a la expresión de los marcadores CD24 y CD38 en CMN de pacientes con EChC e individuos no infectados. A-B) Frecuencia de células B (CD19<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) e intensidad de fluorescencia (IFM) para CD19 en las células B en los pacientes con EChC (G0, G1) y donantes no infectados (NI). C) Gráficos de puntos representativos para un paciente sin compromiso cardíaco (G0), con alteraciones cardíacas (G1) y un individuo no infectado (NI), que ilustran la estrategia de análisis citométrico utilizada para determinar las subpoblaciones dentro del total de las células B. De acuerdo a los niveles de expresión de CD24 y CD38, las células B se clasificaron en: CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> (inmaduras transicionales), CD19<sup>+</sup>CD24<sup>int</sup>CD38<sup>int</sup> (vírgenes maduras), CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>-</sup> (memoria), CD19<sup>+</sup>CD24<sup>low</sup>CD38<sup>high</sup> (plasmablastos). D) Frecuencia de subpoblaciones de células B en los pacientes con EChC y en donantes NI. Cada símbolo representa el dato de un individuo. Dentro del grupo G1, los círculos llenos corresponden a pacientes clasificados como K1, el triángulo vacío a un paciente K2 y el cuadrado vacío a un paciente K3. Los gráficos de cajas muestran el valor de la

mediana y el rango intercuartílico. Se indica con un asterisco las diferencias significativas entre grupos (\*)  $p < 0,05$ .

Adicionalmente, se analizó la frecuencia de células B en relación a la expresión de los marcadores CD24 y CD27 o CD27 y CD38. En la **Figura 3.1.2 A-B** se ilustra la estrategia de análisis citométrico utilizada para definir cada subpoblación en un donante representativo del grupo NI. Este análisis no mostró diferencias significativas al comparar las diversas frecuencias entre los grupos evaluados (**Figura 3.1.2 C-D**).

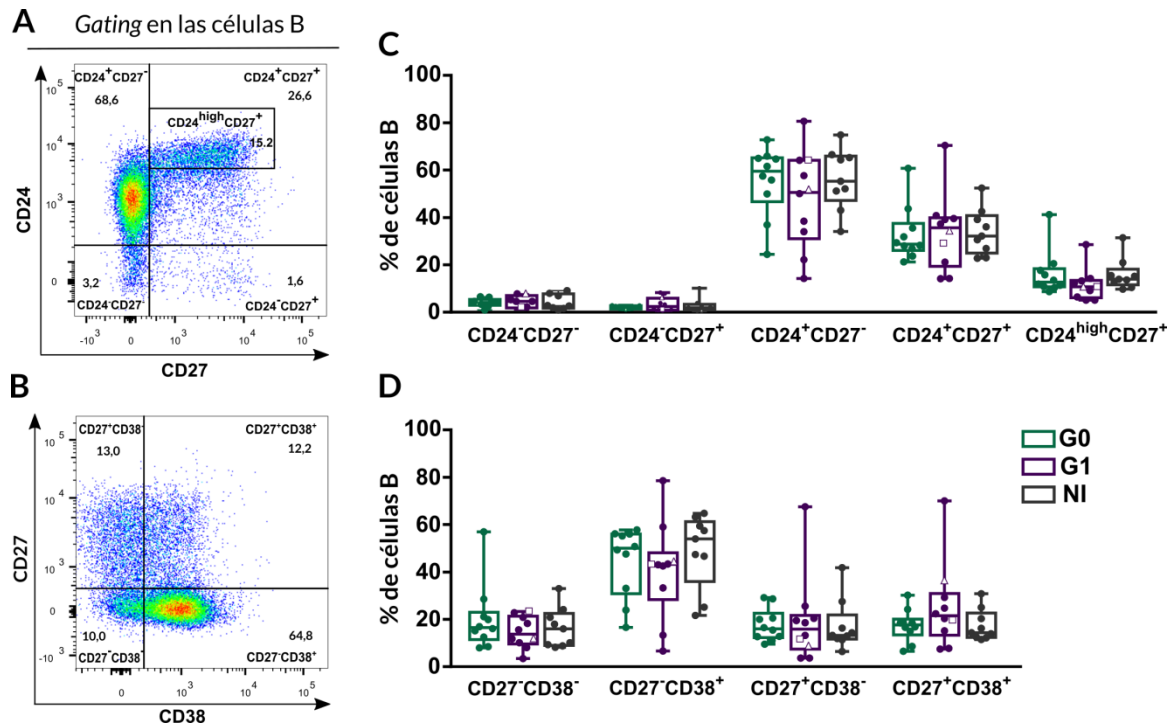


Figura 3.1.2. Distribución fenotípica *ex vivo* de células B de acuerdo a la expresión de los marcadores CD24-CD27 y CD27-CD38 en CMN de pacientes con EChC e individuos no infectados. A-B) Gráficos de puntos representativos de un individuo no infectado que ilustran la estrategia de análisis citométrico utilizada para determinar las subpoblaciones dentro del total de las células B de acuerdo a la expresión combinada de CD24-CD27 y CD27-CD38, respectivamente. C-D) Frecuencia de subpoblaciones de células B en los pacientes con EChC (G0, G1) y en donantes no infectados (NI). Cada símbolo representa el dato de un individuo. Dentro del grupo G1, los círculos llenos corresponden a pacientes K1, el triángulo vacío a un paciente K2 y el cuadrado vacío a un paciente K3. Los gráficos de cajas muestran el valor de la mediana y el rango intercuartílico.

Siendo IL-10 la marca funcional que define al compartimento principal de células B regulatorias, y con el objetivo de caracterizar *ex vivo* a la población B10, se comparó la frecuencia total de estas células en las CMN de los pacientes con las distintas formas clínicas de la EChC y los donantes no infectados. La estrategia de análisis por citometría de flujo utilizada se muestra en la **Figura 3.1.3 A**. Los resultados no mostraron diferencias

significativas en la frecuencia de células B10 entre los grupos, así como tampoco en la expresión de IL-10 en las células B, determinada por la IFM para esta citoquina (**Figura 3.1.3 B-C**).

Posteriormente, se realizó el análisis de la distribución fenotípica en base a los niveles de expresión de CD24 y CD38 en las células B10 ( $CD3^+CD19^+IL-10^+$ ) (**Figura 3.1.3 D**). Los resultados evidenciaron que los pacientes con alteraciones cardíacas (G1) presentaron un incremento significativo en la frecuencia de las células B10 vírgenes ( $IL-10^+CD24^{int}CD38^{int}$ ), y una tendencia a una mayor frecuencia de las células B10 transicionales ( $IL-10^+CD24^{high}CD38^{high}$ ) con respecto a los donantes no infectados ( $p=0,036$  y  $p=0,085$ ); **Figura 3.1.3 E**). Por el contrario, los pacientes sin alteraciones cardíacas (G0) y los individuos no infectados (NI) mostraron una distribución fenotípica similar (**Figura 3.1.3 E**).

Al comparar la frecuencia de las células B10 de memoria ( $IL-10^+CD24^{high}CD38^{low}$ ), no se hallaron diferencias significativas entre los grupos, aunque se observó un aumento en la frecuencia de las células B10 vírgenes que podría estar asociado a una disminución en la frecuencia de las células B10 de memoria en los pacientes del grupo G1 (**Figura 3.1.3 E**). En este sentido, el análisis de la relación entre ambas subpoblaciones mostró una alteración en el balance de células B10 vírgenes/memoria a favor de la población de células B10 vírgenes, que fue detectada sólo en los pacientes del grupo G1. La relación de células B10 vírgenes/memoria en el grupo G1 fue prácticamente del doble con respecto a los grupos G0 y NI (G1: 0,98, G0: 0,46, NI: 0,42 [se indica el valor de la mediana para cada grupo]; G1 vs. NI:  $p=0,024$ , G1 vs. G0:  $p=0,014$ ).

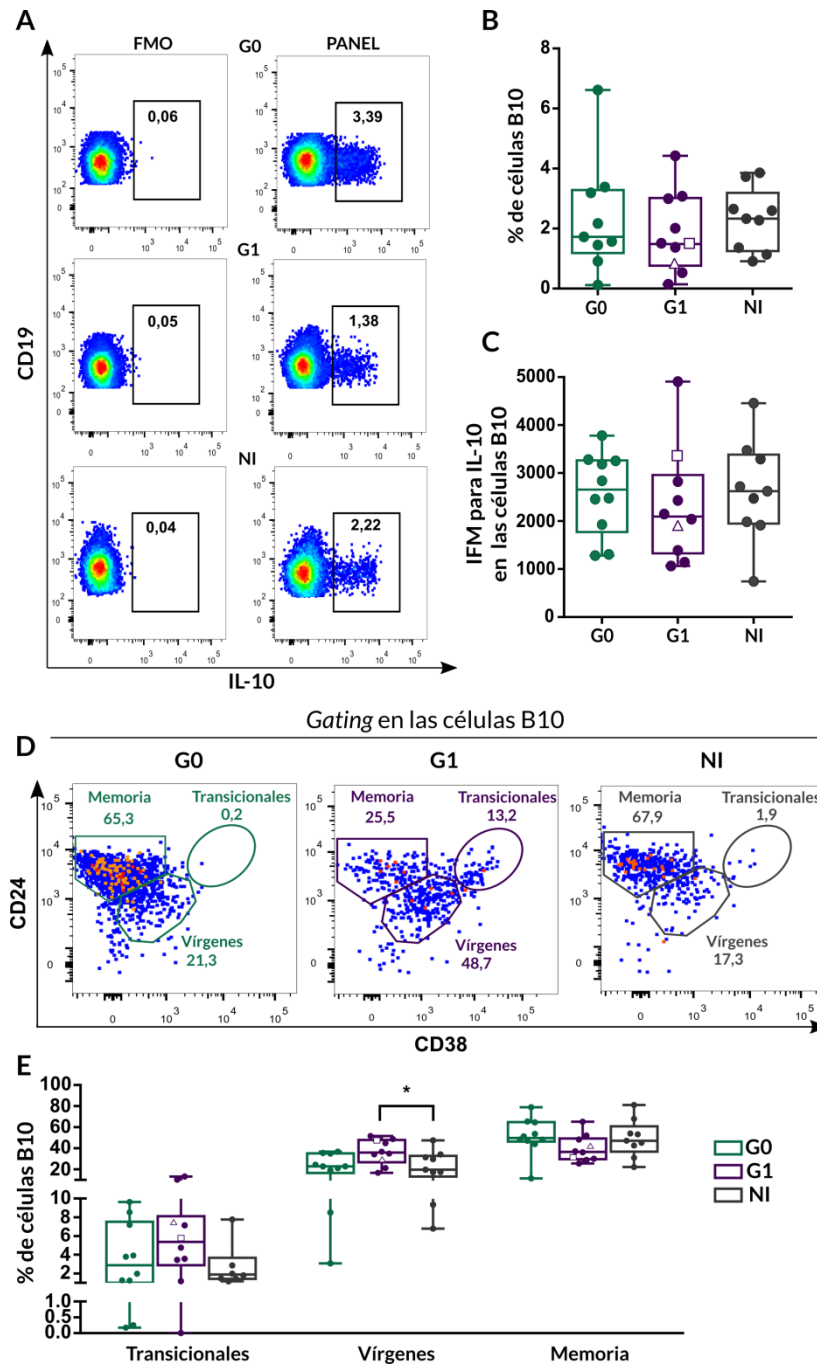


Figura 3.1.3. Frecuencia y distribución fenotípica *ex vivo* de células B10 de acuerdo a la expresión de los marcadores CD24 y CD38 en CMN de pacientes con EChC e individuos no infectados. **A)** Gráficos de puntos representativos para un paciente con EChC sin compromiso cardíaco (G0), con alteraciones cardíacas (G1) y un individuo no infectado (NI), que ilustran la estrategia de análisis citométrico utilizada para determinar la frecuencia de células B10 totales ( $CD3^+CD19^+IL-10^+$ ) en las CMN. Se muestra en los paneles de la izquierda la condición control FMO para IL-10 y en los paneles de la derecha las células marcadas con el panel completo. Se utilizaron puntos gruesos (*large dots*) para facilitar la visualización de los eventos. **B-C)** Frecuencia de células B10 e intensidad de fluorescencia media (IFM) para IL-10 en las células B10 en los distintos grupos de pacientes con EChC e individuos NI. **D)** Estrategia de análisis citométrico utilizada para evaluar la distribución fenotípica de las células B10 en base a los niveles de expresión de CD24 y CD38. Se muestra un individuo representativo para cada grupo (G0, G1, NI). **E)** Frecuencia de subpoblaciones de células B10 en los pacientes con EChC y en donantes NI. Cada símbolo representa el dato de un individuo. Los gráficos de cajas

---

muestran el valor de la mediana y el rango intercuartílico. Dentro del grupo G1, los círculos llenos corresponden a pacientes K1, el triángulo vacío a un paciente K2 y el cuadrado vacío a un paciente K3. Se indican con un asterisco las diferencias significativas (\*)  $p < 0,05$ .

---

Dado que CD27 es el marcador general de células B de memoria en humano, se determinó la frecuencia de células B10 de acuerdo a la expresión de CD27 solo, y en combinación con CD24 y CD38. Las células B10 se hallaron mayormente en el compartimiento CD27<sup>+</sup> (memoria) en los donantes no infectados, y en los pacientes con EChC de ambos grupos (G0, G1) se observó el mismo patrón de distribución (CD27<sup>+</sup> vs. CD27<sup>-</sup> en NI:  $p < 0,0001$ , G0:  $p = 0,0013$ , G1:  $p = 0,0026$ ; **Figura 3.1.4 A-B**). Asimismo, si bien esta diferencia en la frecuencia de células B10 dentro de las poblaciones de memoria y vírgenes fue más significativa en los donantes NI que en los pacientes con EChC (G0, G1), el análisis estadístico global no mostró diferencias significativas entre los grupos.

Por otro lado, al analizar la distribución fenotípica de las células B10 en base a los niveles de expresión de las combinaciones CD27-CD24 y CD27-CD38, se halló que los pacientes con EChC con compromiso cardíaco (G1) mostraron un incremento en la frecuencia de las células B10 CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> en comparación con los grupos G0 y NI ( $p = 0,041$  y  $p = 0,028$  respectivamente; **Figura 3.1.4 C-D**). Las frecuencias de subpoblaciones de células B10 de acuerdo a la expresión de CD27-CD38 no mostraron diferencias significativas entre los grupos (**Figura 3.1.4 E-F**).

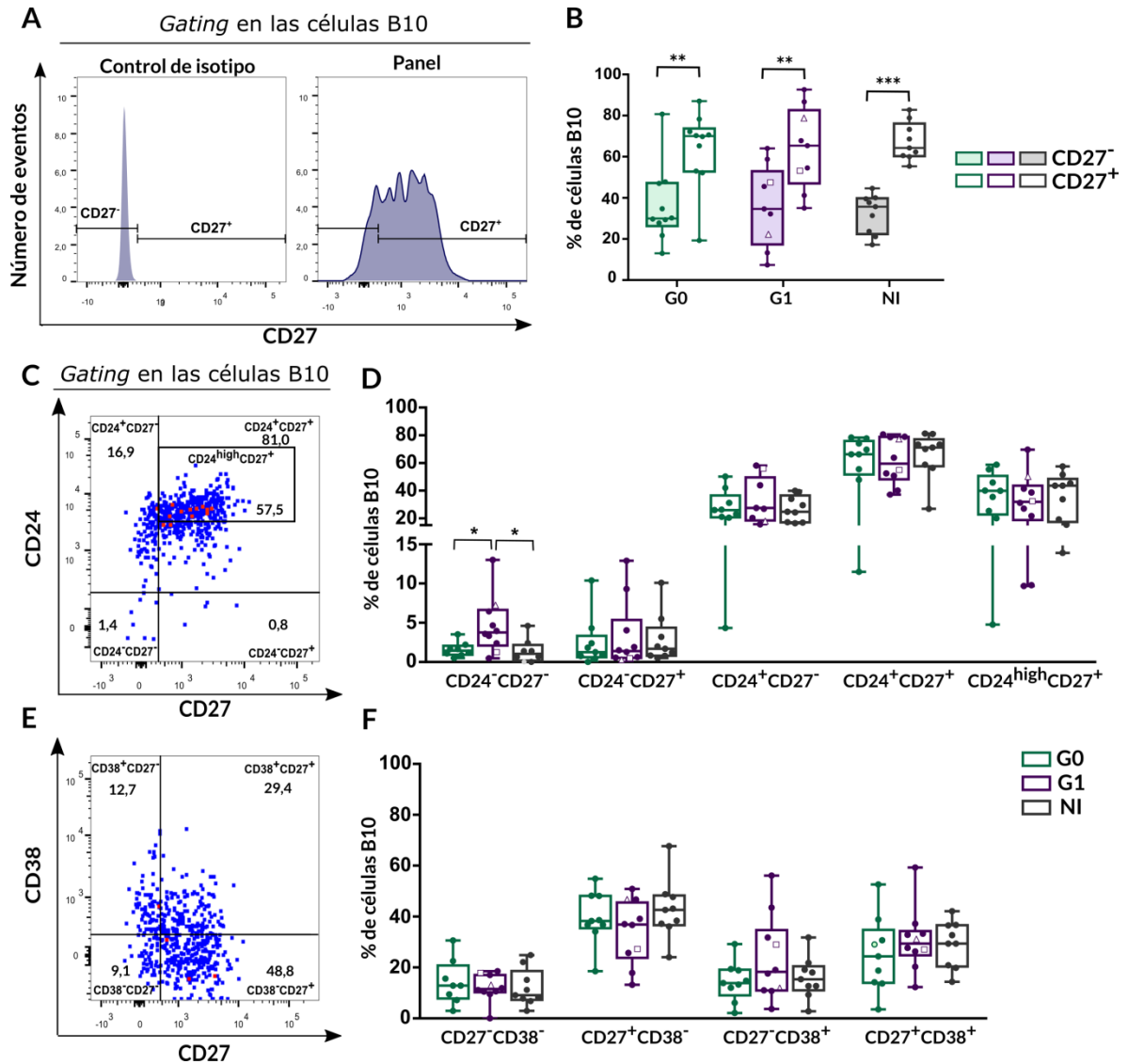


Figura 3.1.4. Distribución fenotípica *ex vivo* de las células B10 de acuerdo a la expresión de los marcadores CD27, CD27-CD24 y CD27-CD38 en CMN de pacientes con EChC e individuos no infectados. **A)** Histograma de fluorescencia representativo correspondiente a un individuo no infectado que ilustra la estrategia de análisis citométrico utilizada para determinar la frecuencia de células B10 CD27<sup>+</sup> y CD27<sup>-</sup> en las CMN. **B)** Frecuencia de células B10 vírgenes (CD27<sup>-</sup>) y de memoria (CD27<sup>+</sup>) en los grupos de pacientes con EChC (G0, G1) e individuos no infectados (NI). **C, E)** Estrategia de análisis citométrico utilizada para evaluar la distribución fenotípica de las células B10 en base a los niveles de expresión de CD27-CD24 y CD27-CD38, respectivamente. Se muestran los gráficos representativos de un individuo NI. Se utilizaron puntos gruesos (*large dots*) para facilitar la visualización de los eventos. **D, F)** Frecuencia de subpoblaciones de células B10 en los pacientes con EChC y en donantes NI. Cada símbolo representa el dato de un individuo. Los gráficos de cajas muestran el valor de la mediana y el rango intercuartílico. Dentro del grupo G1, los círculos llenos corresponden a pacientes K1, el triángulo vacío a un paciente K2 y el cuadrado vacío a un paciente K3. Se indican con asterisco las diferencias significativas (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Debido a que las células B10 no poseen un único marcador o conjunto de marcadores distintivos, la mayoría de los estudios han intentado determinar las

poblaciones de células B más enriquecidas en células B10, entre las que se encuentran en humano las poblaciones  $CD24^{\text{high}}CD38^{\text{high}}$  y  $CD24^{\text{high}}CD27^+$ . Teniendo esto en cuenta, se determinó la frecuencia de las células  $IL-10^+$  dentro de estas dos subpoblaciones enriquecidas ( $CD19^+CD24^{\text{high}}CD38^{\text{high}}$ , **Figura 3.1.5 A** y  $CD19^+CD24^{\text{high}}CD27^+$ , **Figura 3.1.5 B**). Al no observarse diferencias significativas entre los grupos (**Figura 3.1.5 C-D**), los resultados sugieren que estas subpoblaciones fenotípicas están igualmente enriquecidas en células B10 en los pacientes con EChC y en individuos no infectados.

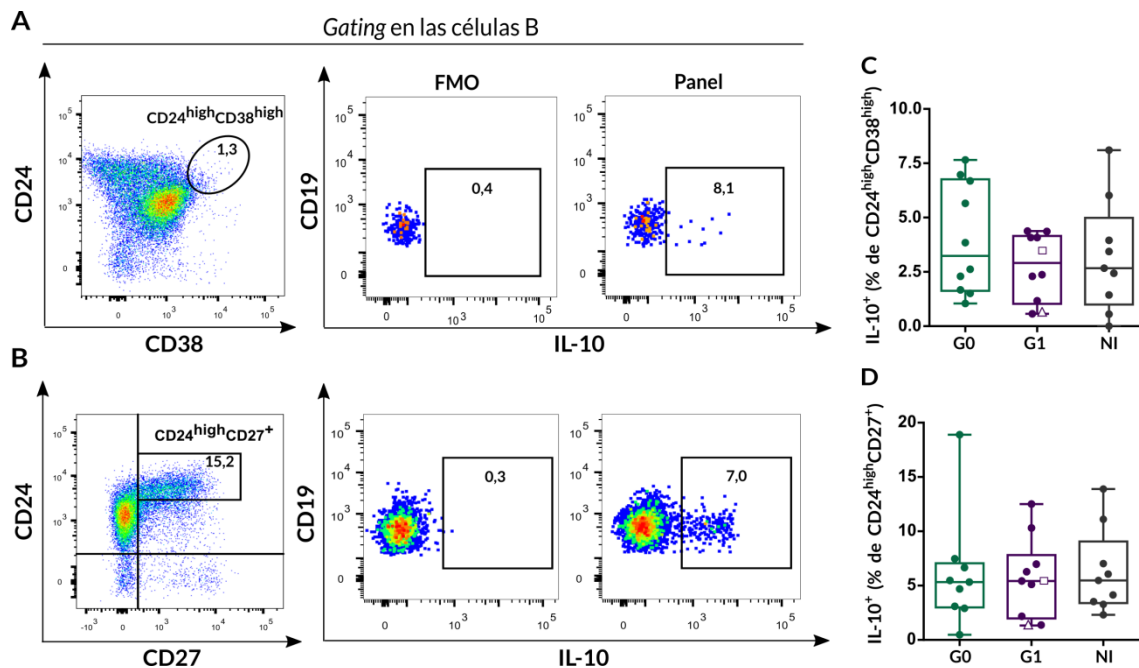


Figura 3.1.5. Frecuencia de células B10 dentro de las subpoblaciones  $CD24^{\text{high}}CD38^{\text{high}}$  (transicionales) y  $CD24^{\text{high}}CD27^+$  (memoria) en CMN de pacientes con EChC e individuos no infectados. A-B) Estrategia de análisis citométrico utilizada para determinar la frecuencia de células B10 dentro de las subpoblaciones  $CD24^{\text{high}}CD38^{\text{high}}$  y  $CD24^{\text{high}}CD27^+$ , respectivamente. Se muestran los gráficos representativos correspondientes a un individuo no infectado. Se utilizaron puntos gruesos (*large dots*) para facilitar la visualización de los eventos positivos. C-D) Frecuencia de células B10 dentro de las subpoblaciones de células transicionales ( $CD24^{\text{high}}CD38^{\text{high}}$ ) y de memoria ( $CD24^{\text{high}}CD27^+$ ) en pacientes con EChC (G0, G1) e individuos no infectados (NI). Cada símbolo representa el dato de un individuo. Dentro del grupo G1, los círculos llenos corresponden a pacientes K1, el triángulo vacío a un paciente K2 y el cuadrado vacío a un paciente K3. Los gráficos de cajas muestran el valor de la mediana y el rango intercuartílico.

Con el fin de estudiar el estado inmunoregulatorio general de los pacientes en relación a la producción de  $IL-10$ , se evaluó la frecuencia de células productoras de esta citoquina en el total de los linfocitos, **Figura 3.1.6 A-B**), dentro de las poblaciones B y T (**Figura 3.1.6 C-D**), así como en las células T  $CD4^+$  y  $CD4^-$  (**Figura 3.1.6 E-H**). Los resultados mostraron que si bien la frecuencia de células  $IL-10^+$  en el total de los linfocitos es similar en los tres grupos, los pacientes sin alteraciones cardíacas (G0)



muestran una tendencia a una mayor frecuencia de linfocitos IL-10<sup>+</sup> (**Figura 3.1.6 B**, G0 vs. NI,  $p=0,061$ ). En relación a la fuente de IL-10, se observó que esta citoquina es producida en cantidades comparables por células B (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) y células T (CD3<sup>+</sup>) tanto en los pacientes con EChC como en los controles (**Figura 3.1.6 D**), no hallándose diferencias significativas ni entre poblaciones (células B - células T) ni tampoco entre los grupos. Dentro de los linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en cuanto a la frecuencia de células IL-10<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (**Figura 3.1.6 F**); sin embargo, se detectó un aumento en la frecuencia de células IL-10<sup>+</sup> en la población CD4<sup>-</sup> de los pacientes sin compromiso cardíaco (G0) en comparación con los individuos no infectados y una tendencia en los pacientes con cardiopatía con respecto a los NI (G0 vs. NI,  $p=0,043$ ; G1 vs. NI,  $p=0,082$ ; **Figura 3.1.6 H**).

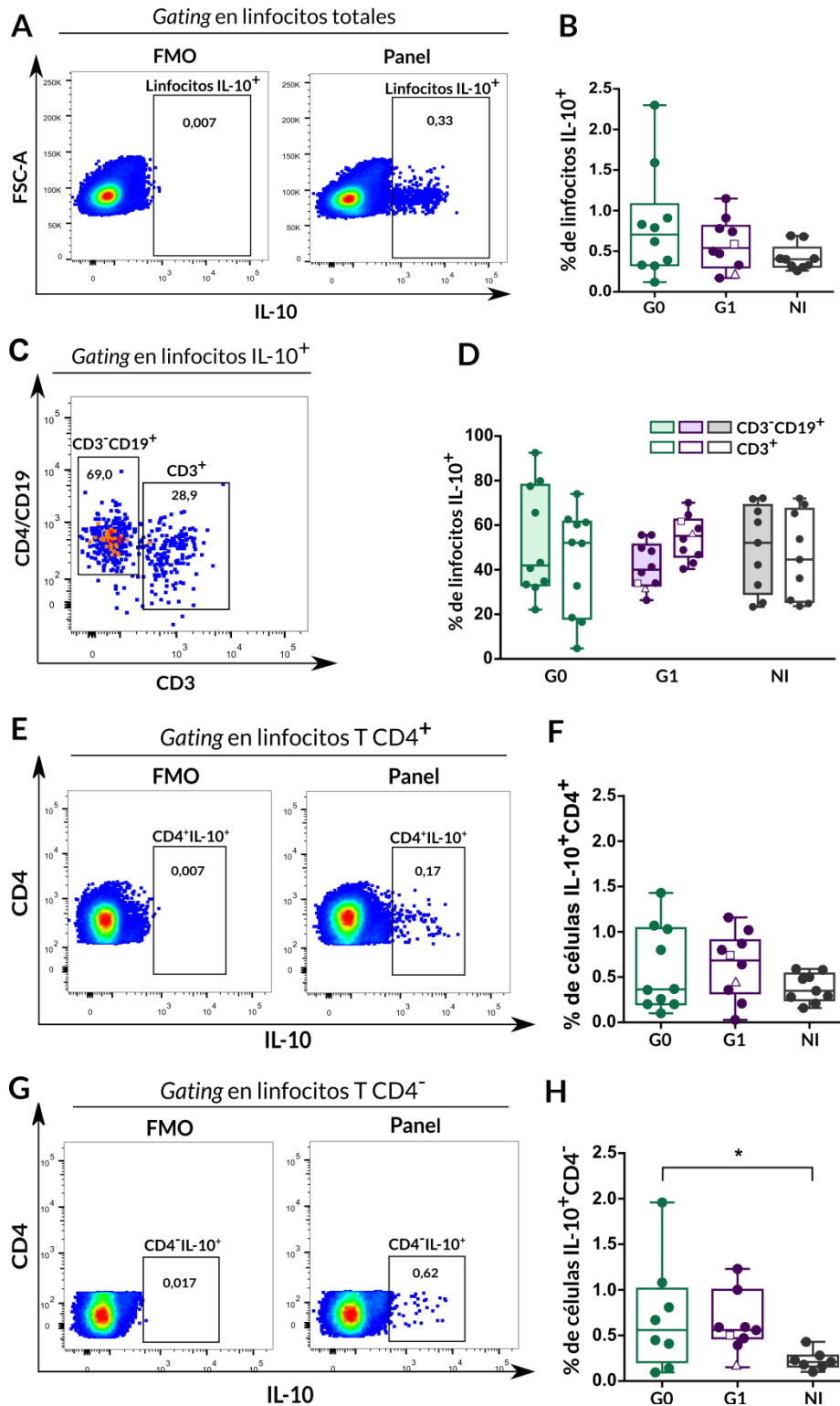


Figura 3.1.6. Producción de IL-10 en linfocitos totales, células B y células T en pacientes con EChC e individuos no infectados. **A)** Estrategia de análisis citométrico utilizada para determinar la frecuencia de células IL-10<sup>+</sup> dentro del total de los linfocitos. Se muestra el gráfico representativo de un individuo no infectado. **B)** Frecuencia de células IL-10<sup>+</sup> dentro de los linfocitos totales (FSC-A vs. SSC-A) en pacientes con EChC (G0, G1) e individuos no infectados (NI). **C)** Estrategia de análisis citométrico utilizada para determinar la distribución de células IL-10<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos B (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) y T (CD3<sup>+</sup>). Se muestra el gráfico de un individuo no infectado

representativo. **D)** Frecuencia de células IL-10<sup>+</sup> dentro de la población de linfocitos B (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) y T (CD3<sup>+</sup>) en pacientes con EChC e individuos NI. **E, G)** Estrategia de análisis citométrico para determinar las células IL-10<sup>+</sup> dentro de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD4<sup>-</sup>, respectivamente. **F, H)** Frecuencia de células IL-10<sup>+</sup> dentro de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD4<sup>-</sup>, respectivamente. Cada símbolo representa el dato de un individuo. Dentro del grupo G1, los círculos llenos corresponden a pacientes K1, el triángulo vacío a un paciente K2 y el cuadrado vacío a un paciente K3. Los gráficos de cajas muestran el valor de la mediana y el rango intercuartílico. Se indican las diferencias significativas con un asterisco (\*)  $p < 0,05$ .

Con el objetivo de evaluar la posible relación entre los niveles de anticuerpos totales IgG contra *T. cruzi* presentes en el suero de los pacientes con EChC y algunas de las poblaciones de células B y B10 que se hallaron alteradas en los diferentes grupos, se realizó un análisis de correlación de las variables cuyos resultados se presentan en la **Tabla 3.1**. Se puede observar que existe una correlación positiva entre el título de anticuerpos contra *T. cruzi* y el porcentaje de células B10 totales sólo en el grupo de pacientes sin alteraciones cardíacas (G0). Adicionalmente, los niveles de anticuerpos y el porcentaje de células B10 vírgenes se encuentran correlacionados negativamente en los pacientes del grupo G0, mientras que no se encontró correlación entre estas variables en el grupo G1. El porcentaje de células B transicionales y de células B10 CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> no se encuentran asociadas a los niveles de anticuerpos contra *T. cruzi* en ninguno de los grupos.

Tabla 3.1. Análisis de correlación entre los anticuerpos totales de tipo IgG contra *T. cruzi* presentes en el suero de los pacientes con EChC y la frecuencia de poblaciones B y B10.

Grupo G0		
Variables a correlacionar	Coefficiente r de Spearman	p valor
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - % B transicionales	-0,2485	0,4918
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - % B10 totales	0,8000	<b>0,0138</b>
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - % B10 transicionales	-0,2364	0,5135
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - % B10 vírgenes	-0,6727	<b>0,0390</b>
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - % B10 CD24 <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup>	0,5389	0,1769
Grupo G1		
Variables a correlacionar	Coefficiente r de Spearman	p valor
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - % B transicionales	0,2485	0,4918
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - % B10 totales	0,1758	0,6321
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - % B10 transicionales	0,1273	0,7330
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - % B10 vírgenes	0,1394	0,7072
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - % B10 CD24 <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup>	-0,1758	0,6321

### **3.2. Caracterización *in vitro* de las células B y B10 a partir de células B aisladas de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica frente al estímulo con *T. cruzi* y frente al estímulo inespecífico con CpG+CD40L.**

Con el fin de caracterizar la población de células Breg en los pacientes con EChC frente al estímulo *in vitro* con *T. cruzi*, se evaluó la expresión de los marcadores de superficie CD24, CD27 y CD38 en las células B totales (CD19<sup>+</sup>) y en las células B10 (CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>) en muestras de células B aisladas por selección inmunomagnética a partir de CMN. Las células aisladas se estimularon con lisado total de tripomastigote de *T. cruzi* durante 48 hs y las últimas 5 hs de cultivo se incubaron con PIB. Como controles de estimulación se emplearon células incubadas únicamente con medio de cultivo y las últimas 5 hs con PIB. Las células B y B10 se caracterizaron por citometría de flujo. Adicionalmente, se cuantificaron los niveles de IL-10 e IL-17 secretadas en el sobrenadante de cultivo mediante ensayos de ELISA.

En primer lugar, se analizó la frecuencia de subpoblaciones de células B en base a la expresión de CD24 y CD38. En la **Figura 3.2.1 A** se puede visualizar la estrategia de selección de las subpoblaciones en base a la expresión de dichos marcadores. Los resultados mostraron que el estímulo con *T. cruzi* indujo una disminución en la frecuencia de las células B transicionales en los pacientes sin compromiso cardíaco (Control vs. *T. cruzi*, G0:  $p=0,0020$ ), pero no se hallaron diferencias significativas entre grupos (**Figura 3.2.1 B**). En cuanto a la frecuencia de células B vírgenes, de memoria y plasmablastos, no se observaron diferencias significativas frente al estímulo con *T. cruzi*, y tampoco al comparar entre grupos (**Figura 3.2.1 B**).

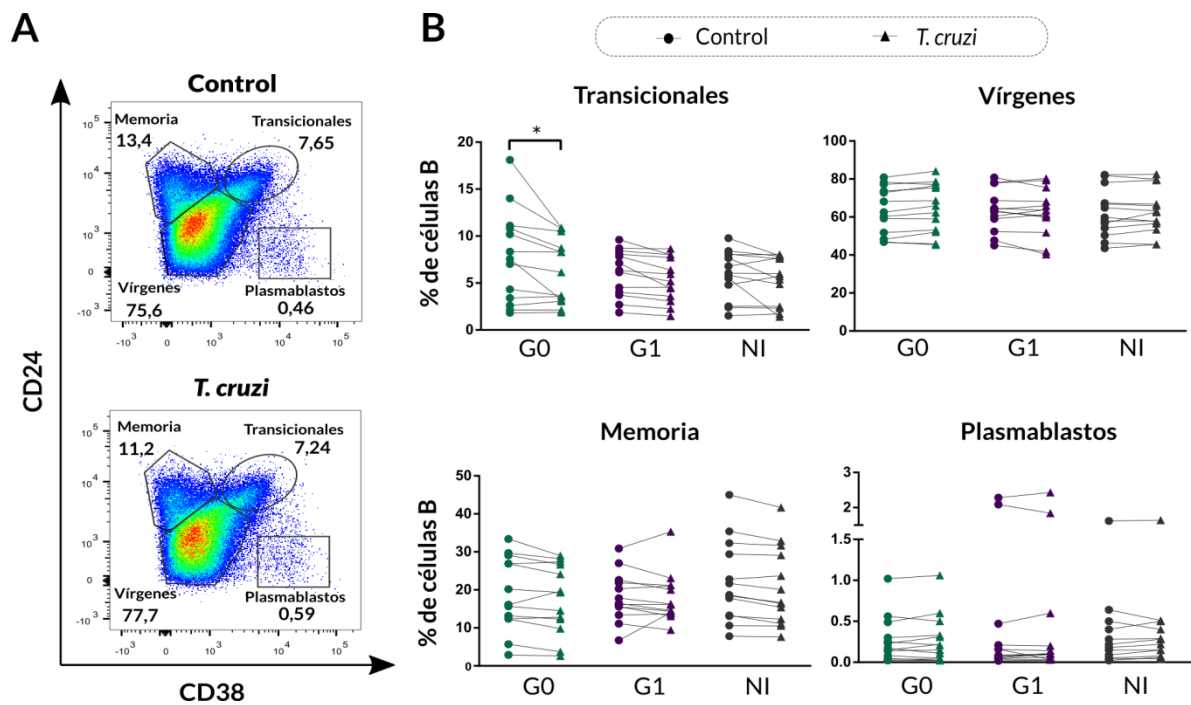


Figura 3.2.1. Distribución fenotípica según la expresión de los marcadores CD24 y CD38 en células B aisladas de pacientes con EChC e individuos no infectados frente al estímulo *in vitro* con *T. cruzi*. **A)** Estrategia de análisis citométrico utilizada para determinar la frecuencia de subpoblaciones de células B en base a los niveles de expresión de CD24 y CD38. Se muestran gráficos representativos correspondientes a un individuo no infectado. **B)** Frecuencia de células B transicionales, vírgenes, de memoria y plasmablastos en pacientes con EChC (G0, G1) e individuos no infectados (NI) en cultivos Control o estimulados con *T. cruzi*. Cada símbolo representa el dato de un individuo. Se indican las diferencias significativas con asterisco (\*)  $p < 0,05$ .

Por otra parte, se realizó el análisis por citometría de flujo de las subpoblaciones de células B determinadas en base a la expresión de los marcadores CD24-CD27 y CD27-CD38 frente al estímulo con *T. cruzi*, como se ilustra en la **Figura 3.2.2 A** y la **Figura 3.2.2 B**. Los resultados mostraron una disminución en la frecuencia de la población B CD24<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> en ambos grupos de pacientes con EChC en los cultivos de células B estimuladas en comparación a los cultivos Control (Control vs. *T. cruzi*, G0:  $p = 0,025$ , G1:  $p < 0,001$ ). Por el contrario, los individuos NI no mostraron diferencias significativas en la frecuencia de esta subpoblación frente al estímulo con *T. cruzi* (**Figura 3.2.2 C**). Por otro lado, se observó un incremento en la frecuencia de las poblaciones B CD24<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> y CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> en los pacientes sin alteraciones cardíacas frente al estímulo con *T. cruzi* (Control vs. *T. cruzi*, G0:  $p = 0,0037$  y  $p < 0,001$ , respectivamente), mientras que los pacientes con cardiopatía y los individuos NI mostraron un aumento significativo de la población CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> (Control vs. *T. cruzi*, G1:  $p < 0,001$ , NI:  $p < 0,001$ ; **Figura 3.2.2 C**). Adicionalmente, se encontró un aumento de la frecuencia de células B CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> en los pacientes con EChC (G0, G1) en comparación con los donantes NI (comparación entre

grupos: G0 vs. NI  $p=0,032$ , G1 vs. NI  $p=0,021$ ; **Figura 3.2.2 C**). Los pacientes con EChC mostraron además una disminución en la frecuencia de la población B CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> con respecto a los individuos NI (comparación entre grupos: G0 vs. NI  $p=0,020$ , G1 vs. NI  $p=0,014$ ; **Figura 3.2.2 C**). Por otro lado, no se hallaron cambios en la frecuencia de esta población al comparar entre la condición de estímulo con *T. cruzi* con respecto al Control. En cuanto a las poblaciones B CD24<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> no se hallaron cambios en la frecuencia frente al estímulo con *T. cruzi*, así como tampoco entre los grupos (**Figura 3.2.2 C**).

En relación a las subpoblaciones B definidas de acuerdo a la expresión de CD27 y CD38, el estímulo con *T. cruzi* indujo una disminución en la frecuencia de la población doble negativa (CD27<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>) en los pacientes con EChC así como en los donantes NI (Control vs. *T. cruzi*, G0:  $p=0,049$ , G1:  $p=0,011$ , NI:  $p=0,0044$ ; **Figura 3.2.2 D**), no hallándose diferencias entre los grupos. Asimismo, no se encontraron alteraciones en las frecuencias de las poblaciones B CD27<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> ni CD27<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> frente al estímulo con *T. cruzi* ni tampoco al comparar entre los grupos (**Figura 3.2.2 D**).

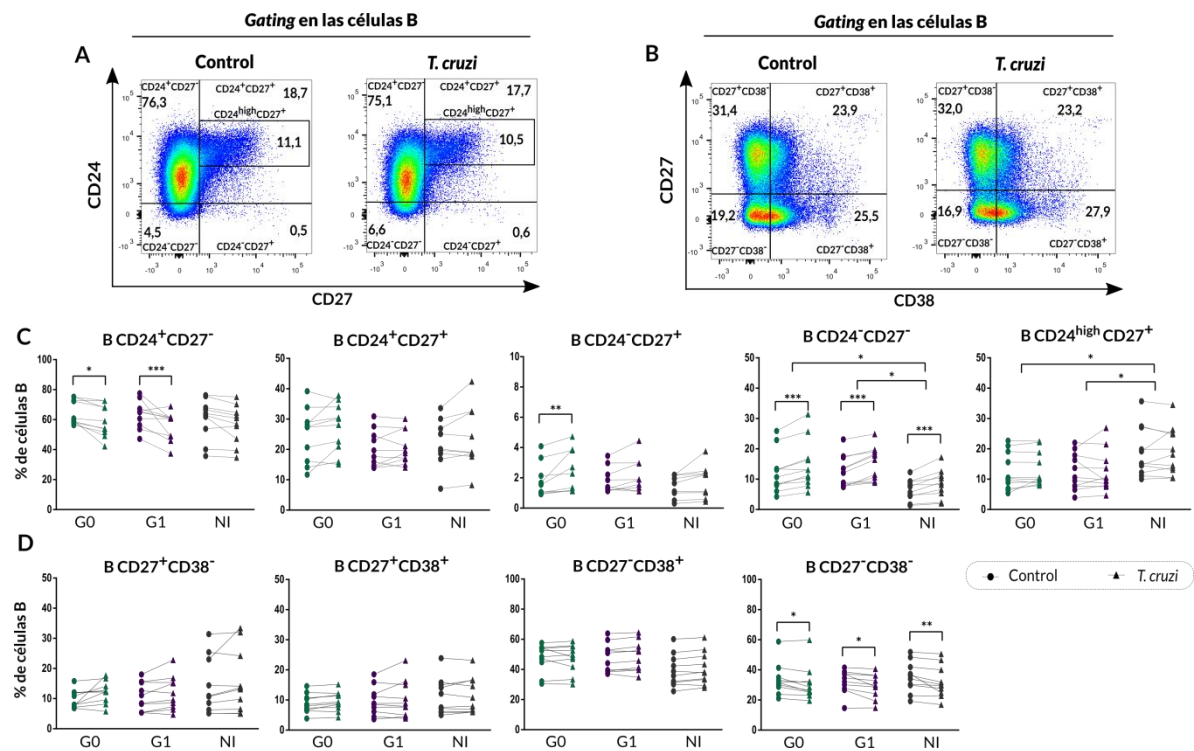


Figura 3.2.2. Distribución fenotípica de las células B de acuerdo a la expresión de los marcadores CD24- CD27 y CD27-CD38 en células B aisladas de pacientes con EChC e individuos no infectados frente al estímulo *in vitro* con *T. cruzi*. A-B) Estrategia de análisis citométrico utilizada para determinar la frecuencia de subpoblaciones de células B en un individuo no infectado representativo, en base a los niveles de expresión de CD24-CD27 y CD27-CD38, respectivamente. C-D) Frecuencia de subpoblaciones de células B en base a la expresión de CD24-CD27 y CD27-CD38 en pacientes con EChC (G0, G1) e individuos no infectados (NI) en cultivos Control o estimulados con *T. cruzi*. Cada

---

símbolo representa el dato de un individuo. Se indican las diferencias significativas con asteriscos (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

---

Adicionalmente, se determinó la distribución fenotípica de las células B incubadas con el estímulo inespecífico CpG+CD40L (ambas moléculas inductoras de la diferenciación al linaje B10). Este estímulo indujo las mismas alteraciones en los pacientes con EChC y en los donantes no infectados para la mayoría de las subpoblaciones evaluadas (**ver sección Apéndice, Tabla 7.4**), excepto en las poblaciones que se mencionan a continuación: un aumento de los plasmablastos sólo en los individuos NI (Control vs. CpG+CD40L, NI:  $p = 0,0032$ ), un aumento de las células CD24<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> en los pacientes de los grupos G1 y NI (Control vs. CpG+CD40L, G1:  $p = 0,013$ ; NI:  $p = 0,0092$ ), una disminución de la población CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> sólo en los individuos NI (Control vs. CpG+CD40L, NI:  $p = 0,0087$ ) y de la población CD27<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> sólo en los pacientes del grupo G1 (Control vs. CpG+CD40L, G1:  $p = 0,0123$ ).

A continuación, se caracterizó la población de células B10 en los pacientes con EChC frente al estímulo con *T. cruzi* y frente al estímulo inespecífico con CpG+CD40L. Como se puede visualizar en la **Figura 3.2.3 A** en un gráfico representativo proveniente del análisis de las células de un individuo NI, se emplearon controles FMO para determinar el punto de corte para las células B IL-10<sup>+</sup> en cada muestra. Los resultados mostraron un aumento en la frecuencia de células B10 totales frente al estímulo con *T. cruzi* tanto en los pacientes con EChC como en los individuos NI (Control vs. *T. cruzi*, G0:  $p = 0,001$ , G1:  $p < 0,001$ , NI:  $p < 0,001$ ; **Figura 3.2.3 B**), no encontrándose diferencias significativas entre los grupos. En cuanto a los niveles de IL-10 en las células B10, se observó un aumento significativo de la IFM para IL-10 en los cultivos estimulados con *T. cruzi* sólo en el grupo de pacientes sin compromiso cardíaco (Control vs. *T. cruzi*, G0:  $p < 0,001$ ; **Figura 3.2.3 C**).

En paralelo y con el objetivo de evaluar la capacidad de las células B de diferenciarse a B10 *in vitro*, se evaluó la frecuencia de células B10 y la IFM para IL-10 en esta población en los cultivos estimulados inespecíficamente con CpG+CD40L. Los resultados mostraron un aumento significativo de la frecuencia de células B10 con respecto al Control, tanto en los pacientes con EChC (grupos G0, G1) como en los individuos NI (Control vs. CpG+CD40L, G0:  $p < 0,0001$ , G1:  $p < 0,0001$ , NI:  $p < 0,0001$ ; **Figura 3.2.3 D**). Aunque no se hallaron diferencias significativas al comparar entre grupos, la magnitud del incremento hallado fue levemente menor en aquellos pacientes con alteraciones cardíacas (porcentaje de incremento (Control vs. CpG+CD40L, G0: 22%,

G1: 19%, NI: 22%). De igual manera, el estímulo inespecífico indujo un aumento significativo del nivel de expresión de IL-10 en las células B10 [IFM] (Control vs. CpG+CD40L, G0:  $p < 0,0001$ , G1:  $p < 0,0001$ , NI:  $p < 0,0001$ ; **Figura 3.2.3 E**), no hallándose diferencias entre los grupos. La magnitud del incremento en la IFM para IL-10 también resultó menor en los pacientes con cardiopatía (porcentaje de incremento (Control vs. CpG+CD40L, G0: 87%, G1: 57%, NI: 78%).

Por otra parte, se analizó la frecuencia de B10 y la IFM para IL-10 frente al estímulo con CpG+CD40L comparando con aquellas células B estimuladas con esta combinación más el agregado de lisado de *T. cruzi*. En los pacientes de los grupos G1 y NI, los cultivos estimulados con CpG+CD40L+*T.cruzi* mostraron una disminución significativa en la frecuencia de células B10 totales con respecto a aquellos cultivos estimulados con CpG+CD40L (CpG+CD40L+*T.cruzi* vs. CpG+CD40L, G1:  $p = 0,024$ , NI:  $p = 0,017$ ; **Figura 3.2.3 F**), mientras que en los pacientes del grupo G0 no se encontraron diferencias, así como tampoco entre los grupos. En relación a la IFM para IL-10 en las B10, no se observaron diferencias entre las condiciones de estimulación mencionadas para ninguno de los grupos (**Figura 3.2.3 G**).



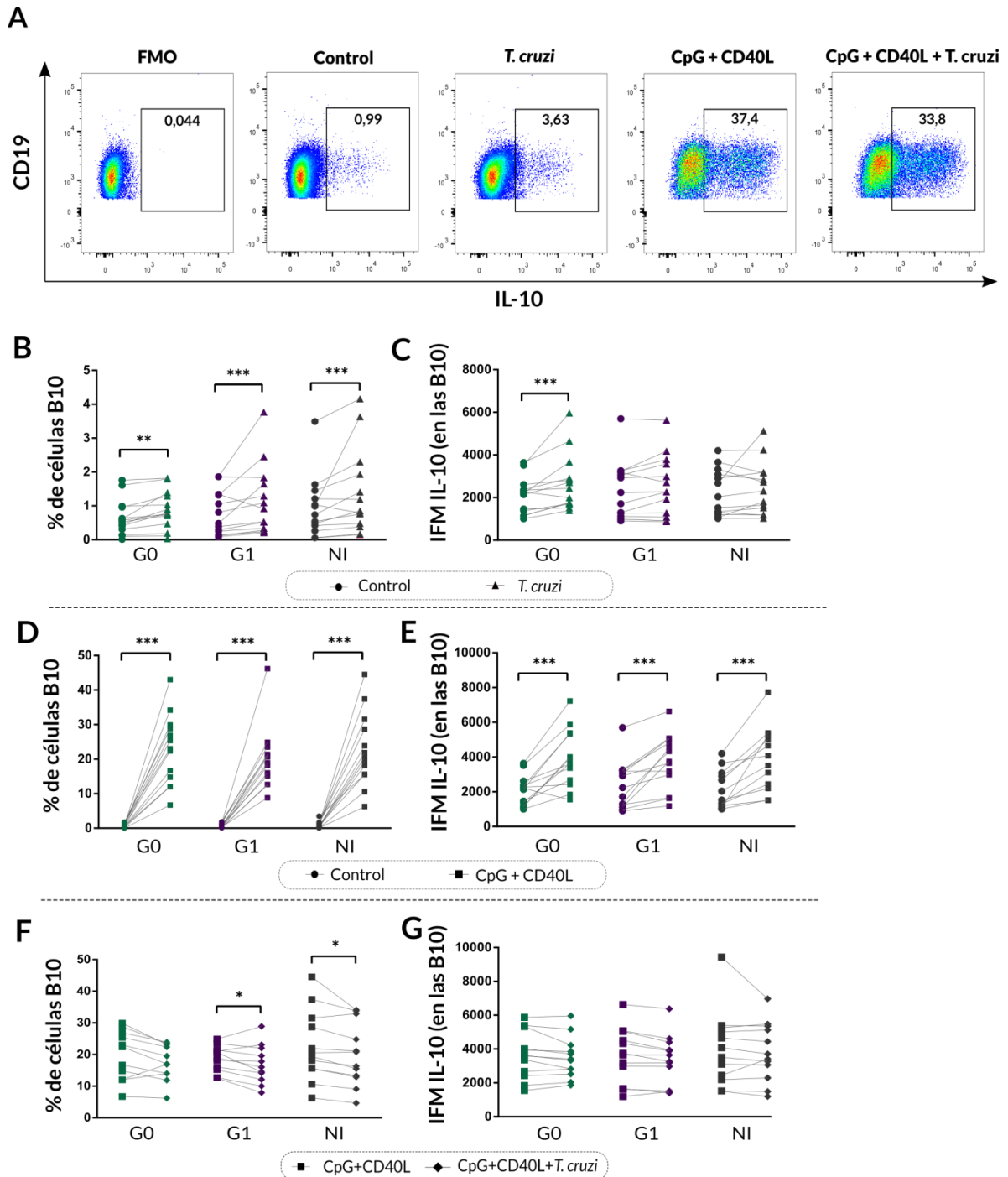


Figura 3.2.3. Frecuencia de células B10 y niveles de IL-10 en células B aisladas de pacientes con EChC e individuos no infectados frente al estímulo con *T. cruzi* y frente al estímulo inespecífico con CpG+CD40L. **A**) Estrategia de análisis utilizada para determinar la frecuencia de células B10 en un individuo no infectado representativo. **B-C**) Frecuencia de células B10 e intensidad de fluorescencia media (IFM) para IL-10 en cultivos de células B Control o estimulados con lisado total de *T. cruzi* en pacientes con EChC (G0, G1) e individuos no infectados (NI). **D-E**) Frecuencia de células B10 e IFM para IL-10 en cultivos Control o estimulados con CpG+CD40L. **F-G**) Frecuencia de células B10 e IFM para IL-10 en cultivos de células B estimulados con CpG+CD40L o CpG+CD40L+*T. cruzi*. Cada símbolo representa el dato de un individuo. Se indican las diferencias significativas con asteriscos (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Con el objetivo de estudiar la distribución fenotípica de las células B10 de acuerdo a la expresión de CD24 y CD38, se determinó la frecuencia de células B10 dentro de cada subpoblación: transicionales ( $CD24^{high}CD38^{high}$ ), vírgenes ( $CD24^{int}CD38^{int}$ ), de memoria ( $CD24^{high}CD38^{low}$ ) y plasmablastos ( $CD24^{low}CD38^{high}$ ) en los cultivos de células B Control y en aquellos estimulados con lisado total de *T. cruzi*. En la **Figura 3.2.4 A** se puede visualizar la estrategia de análisis de las subpoblaciones de acuerdo a la expresión de CD24 y CD38. Los resultados evidenciaron una disminución en la frecuencia de células B10 transicionales ( $IL-10^{+}CD24^{high}CD38^{high}$ ) en los pacientes sin compromiso cardíaco (grupo G0) frente al estímulo con *T. cruzi* (Control vs. *T. cruzi*, G0:  $p=0,010$ ; **Figura 3.2.4 B**). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las condiciones Control y *T. cruzi* para los grupos G1 y NI (**Figura 3.2.4 B**). Adicionalmente, el análisis no mostró diferencias significativas entre los grupos. En cuanto a las células B10 con fenotipo vírgenes, de memoria y plasmablastos, no se hallaron diferencias entre las condiciones de estimulación para ninguno de los grupos de pacientes e individuos no infectados (**Figura 3.2.4 B**).

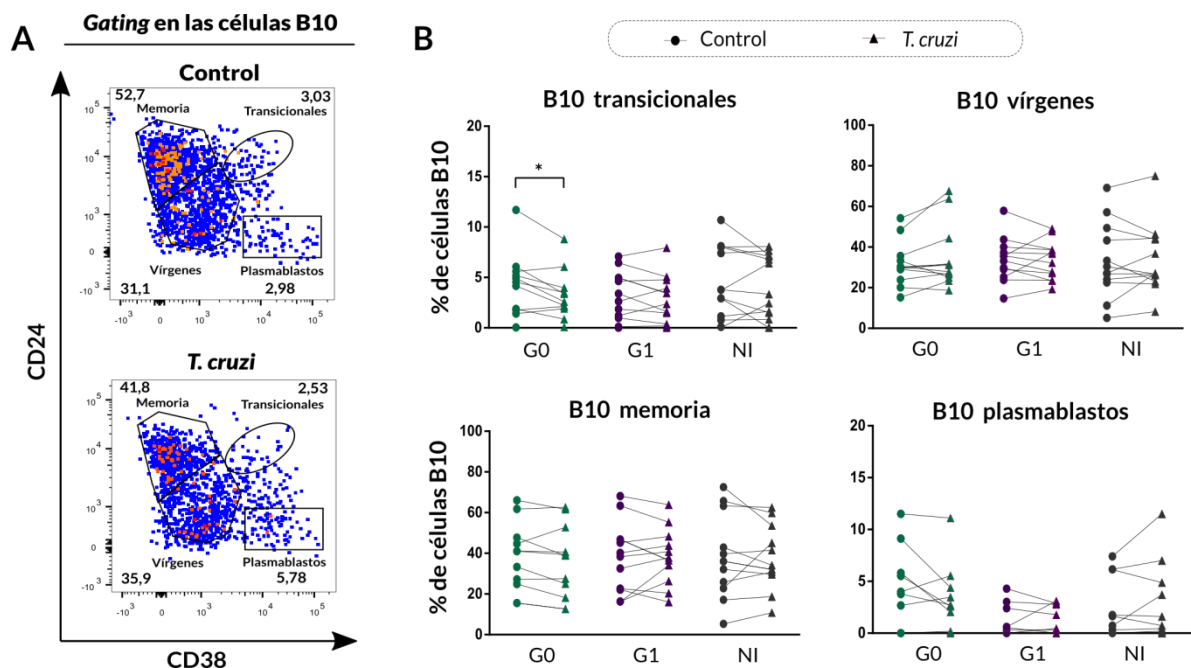


Figura 3.2.4. Distribución fenotípica de las células B10 de acuerdo a la expresión de los marcadores CD24 y CD38 en células B aisladas de pacientes con EChC e individuos no infectados frente al estímulo *in vitro* con *T. cruzi*. **A**) Estrategia de análisis citométrico utilizada para determinar la distribución fenotípica de células B10 en base a la expresión de CD24 y CD38 en cultivos de células B Control o estimulados con lisado total de *T. cruzi*. Se muestra un individuo no infectado representativo. Se utilizaron puntos gruesos (*large dots*) para facilitar la visualización de los eventos. **B**) Frecuencia de células B10 transicionales, vírgenes, de memoria y plasmablastos en los pacientes con EChC (G0, G1) e individuos no infectados (NI) en cultivos Control o estimulados con lisado total

---

de *T. cruzi*. Cada símbolo representa el dato de un individuo. Se indican las diferencias significativas con asteriscos (\*)  $p < 0,05$ .

---

La distribución fenotípica de las células B10 también se evaluó en función de la expresión de los marcadores CD24-CD27 y CD27-CD38 en los cultivos de células B Controles o estimulados con lisado de *T. cruzi*. En la **Figura 3.2.5 A** y la **Figura 3.2.5 B** se puede visualizar la estrategia de análisis utilizada para determinar las diferentes subpoblaciones de células B10 en un individuo representativo definidas por la expresión de CD24-CD27 y CD27-CD38, respectivamente. Los resultados hallados mostraron un aumento en la frecuencia de las células B10 con fenotipo CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> en los pacientes con cardiopatía frente al estímulo con lisado de *T. cruzi* (Control vs. *T. cruzi*, G1:  $p=0,013$ ; **Figura 3.2.5 C**); no se encontraron diferencias significativas en el resto de las subpoblaciones fenotípicas (**Figura 3.2.5 C**). El análisis de las subpoblaciones determinadas por la expresión de CD27 y CD38, mostró una disminución en la frecuencia de las células B10 CD27<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> así como un aumento en la frecuencia de las B10 CD27<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> en los pacientes con cardiopatía (Control vs. *T. cruzi*,  $p=0,027$  y  $p=0,023$ , respectivamente, **Figura 3.2.5 D**), mientras que los pacientes sin alteraciones cardíacas y los donantes no infectados no mostraron diferencias significativas frente al estímulo con *T. cruzi*. Por otro lado, las subpoblaciones fenotípicas de células B10 negativas para CD38 no mostraron alteraciones en la frecuencia al comparar entre la condición de estímulo con *T. cruzi* con respecto al Control, y tampoco entre los grupos. (**Figura 3.2.5 D**).

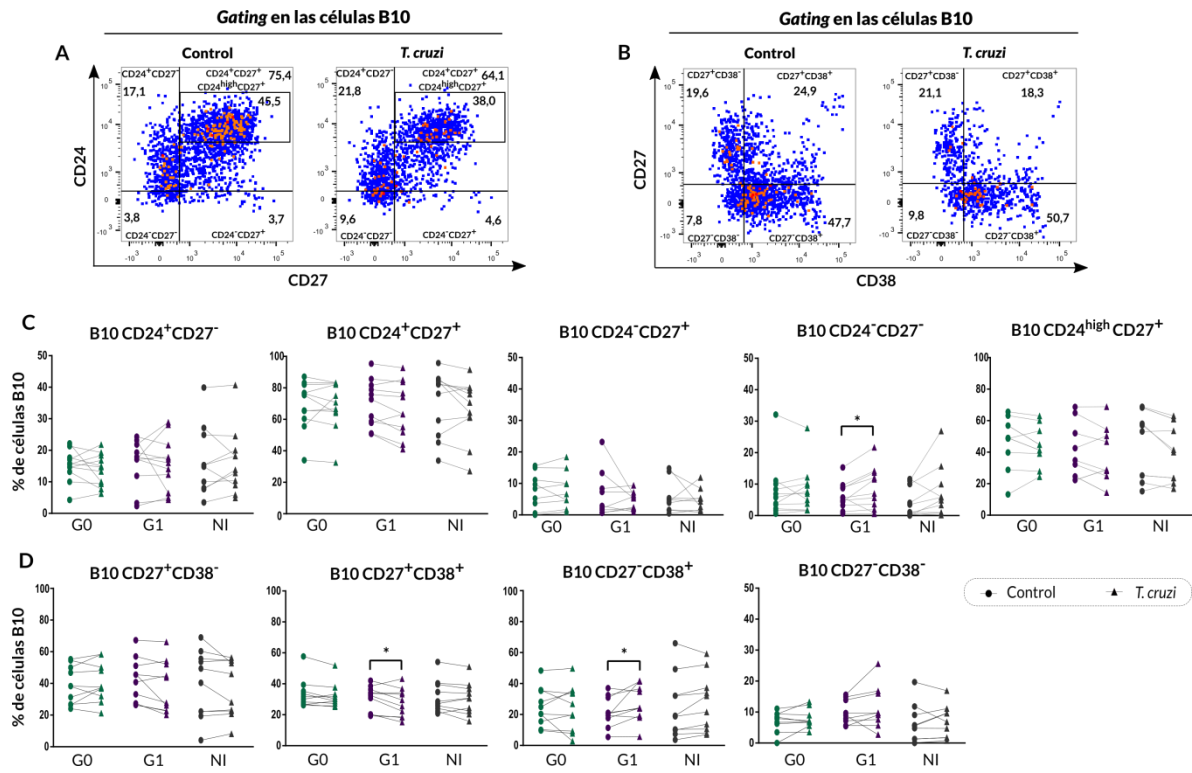


Figura 3.2.5. Distribución fenotípica de las células B10 de acuerdo a la expresión de los marcadores CD24-CD27 y CD27-CD38 en células B aisladas de pacientes con EChC e individuos no infectados frente al estímulo *in vitro* con *T. cruzi*. A-B) Estrategia de análisis citométrico utilizada para determinar la frecuencia de subpoblaciones de células B10 en base a la expresión de CD24-CD27 y CD27-CD38 en cultivos de células B Control o estimulados con lisado total de *T. cruzi*. Se muestra un individuo no infectado representativo. Se utilizaron puntos gruesos (*large dots*) para facilitar la visualización de los eventos. C-D) Frecuencia de células B10 en base a la expresión de CD24-CD27 y CD27-CD38 respectivamente, en los pacientes con EChC (G0, G1) e individuos no infectados (NI) en cultivos Control o estimulados con lisado total de *T. cruzi*. Cada símbolo representa el dato de un individuo. Se indican las diferencias significativas con asteriscos (\*)  $p < 0,05$ .

De igual manera que en el análisis de las células B, se estudió la distribución fenotípica de las células B10 frente al estímulo inespecífico con CpG+CD40L (ver sección Apéndice, Tabla 7.4). Este análisis mostró alteraciones similares en las frecuencias de los distintos fenotipos entre los grupos, excepto para la población CD27<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>, para la cual se observó un aumento en los pacientes con EChC, que no resultó significativo en el grupo de donantes no infectados (Control vs. CpG+CD40L, G0:  $p = 0,0032$ , G1:  $p = 0,0042$ ).

La secreción de IL-10 e IL-17 en el sobrenadante de cultivo de las células B estimuladas *in vitro* se cuantificó mediante la técnica de ELISA. Los resultados mostraron que el estímulo con *T. cruzi* indujo un aumento significativo de la secreción de IL-10 al sobrenadante tanto en los pacientes con EChC como en los donantes no infectados (Control vs. *T. cruzi* G0:  $p < 0,001$ , G1:  $p < 0,001$ , NI:  $p < 0,001$ ; Figura 3.2.6 A). Además, no se encontraron diferencias en los niveles de IL-10 secretada al comparar entre los grupos.

En cuanto a la secreción de IL-17, los pacientes con cardiopatía (G1) presentaron un aumento de esta citoquina en el sobrenadante de las células B estimuladas con *T. cruzi* con respecto al Control (Control vs. *T. cruzi*, G1:  $p < 0,001$ ), mientras que los grupos G0 y NI no evidenciaron diferencias significativas en los niveles de dicha citoquina. Al comparar entre grupos, se hallaron diferencias significativas sólo entre el grupo G1 y NI (G1 vs. NI,  $p = 0,031$ ; **Figura 3.2.6 B**).

En el caso de la IL-10, también se evaluaron los niveles de citoquina en el sobrenadante en las células B estimuladas con CpG+CD40L, mostrando niveles aumentados con respecto al Control sin distinción entre los grupos (Control vs. CpG+CD40L, G0:  $p < 0,001$ , G1:  $p < 0,001$ , NI:  $p < 0,001$ ; **Figura 3.2.6 C**). Sin embargo, la magnitud de este aumento fue mayor en los pacientes con cardiopatía (porcentaje de incremento, Control vs. CpG+CD40L, G0: 2930%, G1: 4340%, NI: 1533%).

Por su parte, el estímulo con CpG+CD40L+*T. cruzi* no indujo alteraciones en la IL-10 secretada con respecto al estímulo sólo con CpG+CD40L en ninguno de los grupos (**Figura 3.2.6 D**).

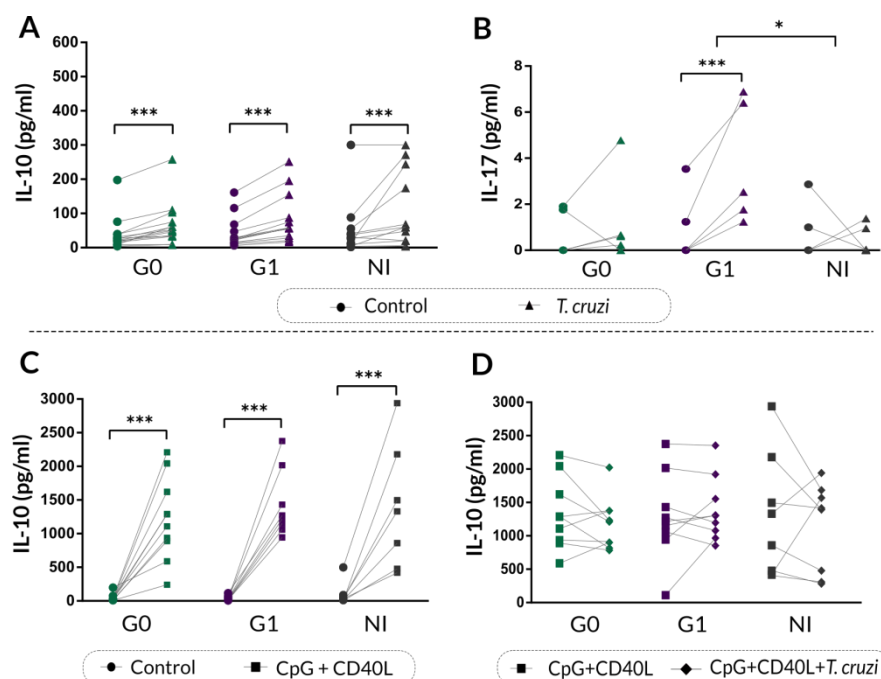


Figura 3.2.6. Secreción de IL-10 e IL-17 en el sobrenadante de las células B de pacientes con EChC e individuos no infectados estimuladas *in vitro* con *T. cruzi* o con el estímulo inespecífico CpG+CD40L. A-B) Niveles de IL-10 e IL-17 secretada (pg/ml de citoquina) secretada al sobrenadante de las células B estimuladas con *T. cruzi* o células B sin estimular (Control) de pacientes con EChC (G0, G1) e individuos NI. C) IL-10 secretada al sobrenadante (pg/ml) en cultivos de células B Control o estimuladas con CpG+CD40L en pacientes con EChC (G0, G1) e individuos no infectados (NI). D) IL-10 secretada al sobrenadante (pg/ml) en cultivos de células B estimuladas con CpG+CD40L o

CpG+CD40L+*T. cruzi* en pacientes con EChC (G0, G1) e individuos no infectados (NI). Cada símbolo representa el dato de un individuo. Se indican las diferencias significativas con asteriscos (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

A continuación, se evaluó la posible asociación entre los niveles de anticuerpos totales IgG contra *T. cruzi* en el suero de los pacientes con EChC y algunas de las variables más relevantes que se hallaron alteradas *in vitro*. El análisis de correlación realizado puede consultarse en la **sección Apéndice, Tabla 7.5**. Los resultados mostraron que no hay correlación entre el título de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* y las variables estudiadas (porcentaje de células B10 totales, IFM para IL-10, IL-10 secretada, porcentaje de células B CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup>, porcentaje de células B CD24<sup>low</sup>CD27<sup>-</sup>).

Finalmente, se evaluó la relación entre algunos de los parámetros asociados a las células B10 en los cultivos controles y la parasitemia (detección de *T. cruzi* por PCR) en la cohorte de pacientes en estudio. Los resultados, que se muestran en la **Tabla 3.2**, evidencian que los pacientes con PCR-, es decir aquellos que presentan valores indetectables de parásitos en sangre por este método, presentan una frecuencia mayor de células B CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup>. Para el resto de las variables evaluadas (% de células B10 totales, IFM para IL-10, IL-10 secretada al sobrenadante y % de células CD24<sup>low</sup>CD27<sup>-</sup>) no existen diferencias que se asocien con la parasitemia, ya que la mediana de los valores es similar en los pacientes con PCR+ (parasitemia detectable) y PCR- (parasitemia no detectable). El mismo análisis también se realizó dentro de cada grupo (G0 - G1), aunque no se hallaron diferencias significativas. Los resultados pueden consultarse en la **Tabla 7.6 en la sección Apéndice**.

Tabla 3.2. Relación entre algunas de las variables más relevantes evaluadas y la parasitemia en los pacientes con EChC.

Variable	Pacientes con PCR+ (n=10)	Pacientes con PCR- (n=16)	p valor
% B10	0,43 (0,11 - 1,41)	0,6 (0,31 - 1,04)	0,5603
IFM IL-10	1587 (1238 - 2329)	2391 (1585 - 3217)	0,1068
pg/ml IL-10 (ELISA)	21,9 (15,04 - 29,72)	32,94 (19,25 - 105,60)	0,0758
% B CD24 <sup>high</sup> CD27 <sup>+</sup>	7,72 (6,47 - 11,70)	16,3 (10,55 - 20,55)	<b>0,007</b>
% B CD24 <sup>low</sup> CD27 <sup>-</sup>	8,54 (7,61 - 20,05)	12,1 (8,45 - 13,45)	0,8829

Se indica para cada variable el valor de la mediana y entre paréntesis el rango intercuartílico.

### 3.3. Caracterización de la expresión de PD-L1<sup>+</sup> en las células B de los pacientes con Enfermedad de Chagas crónica frente al estímulo *in vitro* con *T. cruzi* y con CpG+CD40L.

Dado que las células B pueden modular la respuesta inmune a través de mecanismos independientes de IL-10, por ejemplo a través de la expresión de moléculas regulatorias como PD-L1 (Khan *et al.*, 2015), se decidió caracterizar la expresión de esta molécula (frecuencia de células e intensidad de fluorescencia media [IFM]) en la población de células B aisladas de los pacientes con EChC y en individuos no infectados frente a la estimulación con lisado total de *T. cruzi* o con el estímulo inespecífico CpG+CD40L, en las mismas condiciones de cultivo mencionadas previamente. En la **Figura 3.3.1 A** se representa la estrategia de análisis empleada para evaluar la expresión de PD-L1 en la membrana de las células B por citometría de flujo, donde se muestran los niveles de expresión de esta molécula frente a las distintas condiciones de estimulación (Control, lisado de *T. cruzi*, CpG+ CD40L y CpG+CD40L+lisado de *T. cruzi*) en un individuo representativo.

El análisis de la expresión de PD-L1 en las células B mostró un aumento en la frecuencia de células B PD-L1<sup>+</sup> (CD19<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>) en los pacientes con EChC (grupos G0, G1) en los cultivos estimulados con lisado de *T. cruzi* en comparación con los cultivos control (Control vs. *T. cruzi*, G0:  $p=0,032$ , G1:  $p=0,0029$ ; **Figura 3.3.1 B**). El análisis no mostró diferencias estadísticamente significativas al comparar entre los grupos. En cuanto al grupo de individuos no infectados (NI), no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de células B PD-L1<sup>+</sup> frente a la condición de estimulación con *T. cruzi* (**Figura 3.3.1 B**). Al estudiar la IFM para PD-L1 en las células B (CD19<sup>+</sup>), no se encontraron diferencias significativas entre las condiciones control y estímulo con *T. cruzi* en ninguno de los grupos evaluados (**Figura 3.3.1 C**).

Por otra parte, se estudió la expresión de PD-L1 en las células B frente al estímulo con CpG+CD40L. Los resultados evidenciaron que tanto las células B de los pacientes con EChC como de los individuos NI tienen la capacidad de aumentar la expresión de PD-L1 frente al estímulo con CpG+CD40L, lo que se observó por el incremento de la frecuencia de células CD19<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup> (Control vs. CpG+CD40L, G0:  $p<0,001$ , G1:  $p<0,001$  NI:  $p<0,001$ ; **Figura 3.3.1 D**), así como en el aumento de la IFM para PD-L1 (Control vs. CpG+CD40L, G0:  $p<0,0001$ , G1:  $p<0,0001$ , NI:  $p<0,0001$ ; **Figura 3.3.1 E**). La magnitud del incremento en la frecuencia de células PD-L1<sup>+</sup> fue menor en pacientes con EChC con respecto a los individuos no infectados (porcentaje de incremento, Control vs.

CpG+CD40L, G0: 15%, G1: 17%, NI: 22%) así como también la IFM para PD-L1 (porcentaje de incremento, Control vs. CpG+CD40L, G0: 110%, G1: 107% NI: 146%).

Adicionalmente, se evaluó la frecuencia de células B PD-L1<sup>+</sup> y la IFM para PD-L1 en las células B frente al estímulo con CpG+CD40L en comparación con CpG+CD40L+*T. cruzi*. El análisis no mostró diferencias significativas entre las distintas condiciones de estimulación para ninguno de los grupos de individuos (**Figura 3.3.1 F, G**).

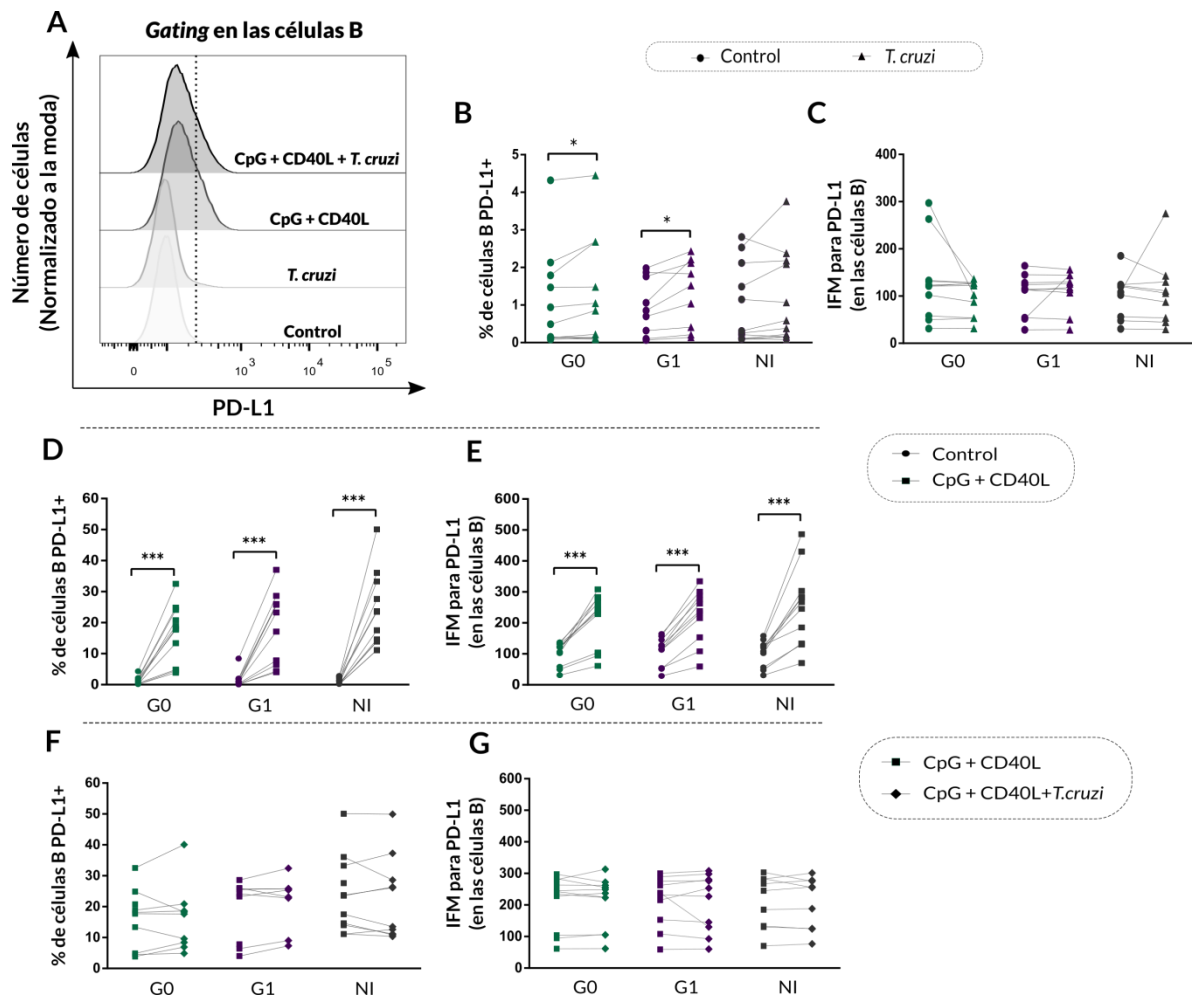


Figura 3.3.1. Expresión de PD-L1 en células B aisladas de pacientes con EChC e individuos no infectados frente al estímulo *in vitro* con *T. cruzi* y con CpG+CD40L. **A**) Histogramas de fluorescencia que muestran la expresión de PD-L1 en cultivos de células B Control, estimuladas con lisado total de *T. cruzi* (*T. cruzi*), CpG+CD40L o CpG+CD40L+*T. cruzi*. Los datos corresponden a un individuo no infectado representativo y la línea punteada indica el punto de corte utilizado para definir la población de células B positivas para PD-L1 (CD19<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>). **B-C**) Frecuencia de células B PD-L1<sup>+</sup> e intensidad de fluorescencia media (IFM) para PD-L1 en cultivos de células B Control o estimuladas con lisado total de *T. cruzi*, en los pacientes con EChC (G0, G1) e individuos no infectados (NI). **D-E**) Frecuencia de células B PD-L1<sup>+</sup> e IFM para PD-L1 en las células B de los pacientes con EChC (G0, G1) e individuos no infectados (NI) en cultivos Control o estimulados con CpG+CD40L. **F-G**) Frecuencia de células B PD-L1<sup>+</sup> e IFM para PD-L1 en cultivos de células B estimuladas con CpG+CD40L o con CpG+CD40L+ lisado total de *T. cruzi* en los pacientes con EChC (G0, G1) e



---

individuos no infectados (NI). Cada símbolo representa el dato de un individuo. Se indican las diferencias significativas con asteriscos (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

---

Dado que en ciertas enfermedades autoinmunes como artritis reumatoidea se hallaron alteraciones en los niveles de células B transicionales y de memoria PD-L1<sup>+</sup> (Zacca *et al.*, 2018), se evaluó la expresión de PD-L1 en las distintas subpoblaciones fenotípicas de acuerdo a la expresión de CD24 y CD38 en los cultivos de células B estimuladas con *T. cruzi* y con CpG+CD40L (**Figura 3.3.2 A-B**). Los resultados mostraron que tanto en los pacientes con EChC como en los donantes NI, la subpoblación más enriquecida en células PD-L1<sup>+</sup> es la de plasmablastos, seguida por la de células B transicionales en los cultivos de células B estimuladas con *T. cruzi* (**Figura 3.3.2 C**). En los cultivos de células B estimuladas con CpG+CD40L, por el contrario, la distribución de PD-L1 fue más pareja a lo largo de las subpoblaciones, siendo un poco más elevada en las células B transicionales (**Figura 3.3.2 D**). Al evaluar la frecuencia de células PD-L1<sup>+</sup> en las distintas subpoblaciones entre los grupos, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las dos condiciones de estimulación (**Figura 3.3.2 C-D**).

Adicionalmente y con el objetivo de asociar las alteraciones encontradas en las subpoblaciones fenotípicas de células B en los pacientes con EChC con la posible variación en la expresión de PD-L1, se determinó la frecuencia de células PD-L1<sup>+</sup> y la IFM para esta molécula en las poblaciones CD24<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>, CD24<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>, CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>, CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> y CD27<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> (**Figura 3.3.2 E**; poblaciones que se vieron alteradas frente al estímulo con *T. cruzi*; ver **Figura 3.2.2**). Los resultados mostraron que el estímulo con *T. cruzi* no altera la frecuencia de células PD-L1<sup>+</sup> ni tampoco los niveles de expresión de esta molécula (IFM) en las subpoblaciones fenotípicas mencionadas (**Figura 3.3.2 F-G**).

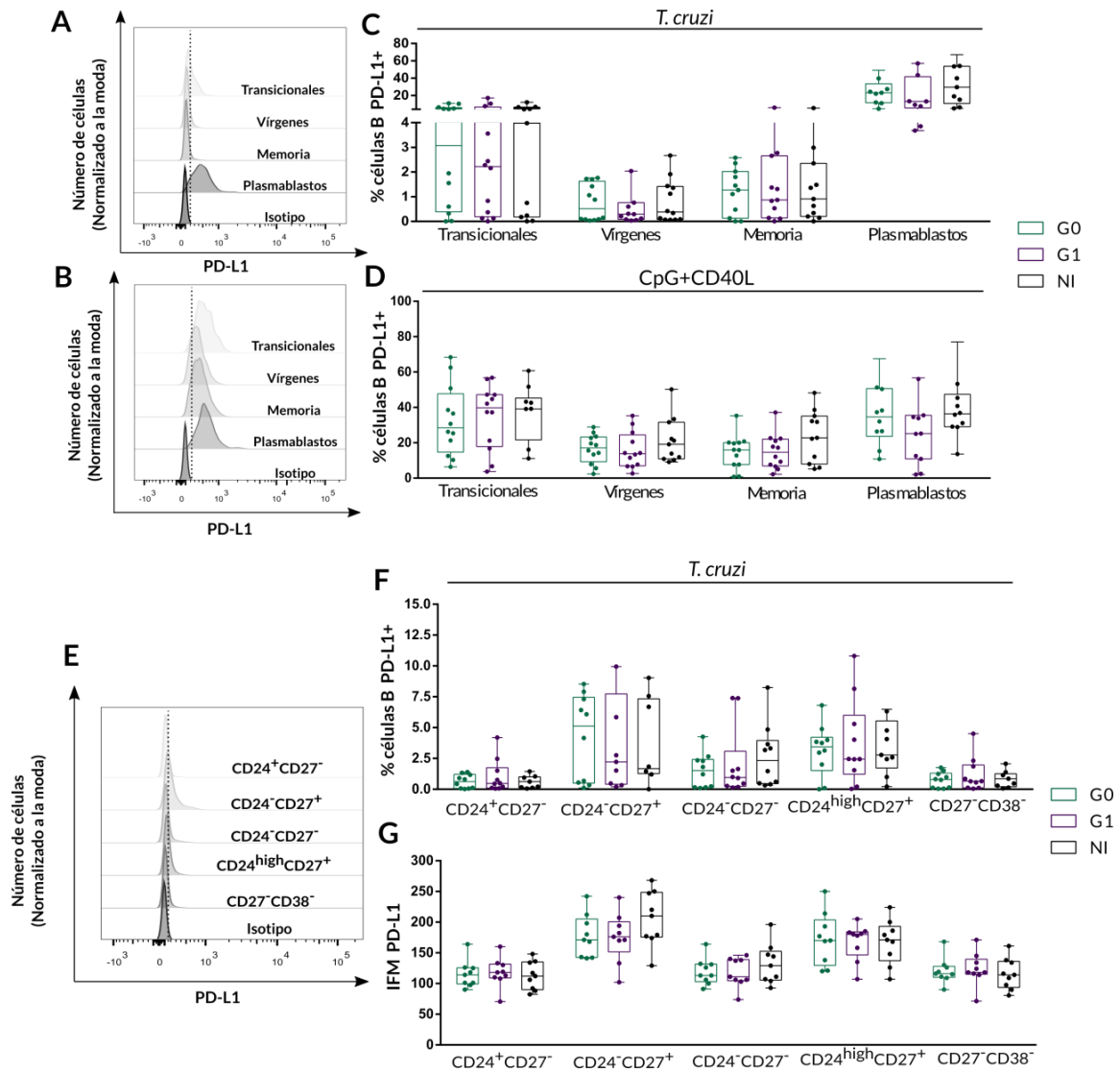
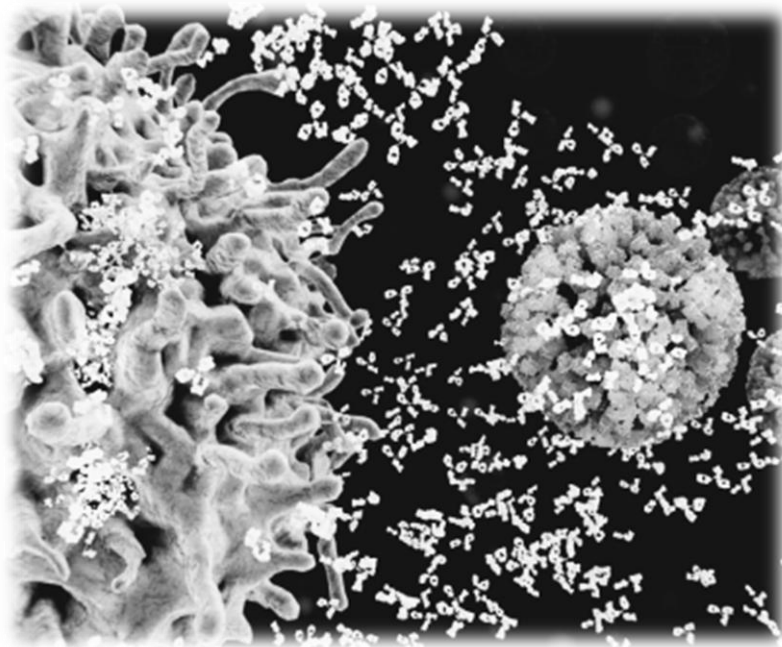


Figura 3.3.2. Expresión de PD-L1 en subpoblaciones de células B aisladas de pacientes con EChC e individuos no infectados frente al estímulo *in vitro* con *T. cruzi* y con CpG+CD40L. A-B) Histogramas de fluorescencia para determinar las células positivas para PD-L1 en las subpoblaciones transicionales, vírgenes, memoria y plasmablastos en cultivos de células B estimulados con *T. cruzi* y con CpG+CD40L respectivamente. Se muestran los gráficos para un individuo no infectado representativo. La línea punteada indica el punto de corte utilizado para definir la población de células B positivas para PD-L1. C-D) Frecuencia de células positivas para PD-L1<sup>+</sup> en las subpoblaciones de células B transicionales, vírgenes, memoria y plasmablastos de pacientes con EChC (G0, G1) e individuos no infectados estimuladas con *T. cruzi* y con CpG+CD40L respectivamente. E) Histogramas de fluorescencia para determinar las células positivas para PD-L1<sup>+</sup> en las subpoblaciones CD24<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>, CD24<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>, CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> y CD27<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> en cultivos de células B estimuladas con *T. cruzi*. Se muestran los gráficos para un individuo no infectado representativo. F) Frecuencia de células positivas para PD-L1<sup>+</sup> en las subpoblaciones CD24<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>, CD24<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>, CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> y CD27<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> en pacientes con EChC e individuos NI en cultivos de células B estimuladas con *T. cruzi*. G) Intensidad de fluorescencia media (IFM) para PD-L1 en las subpoblaciones CD24<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>, CD24<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>, CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> y CD27<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> en pacientes con EChC e individuos NI en cultivos de células B estimuladas con *T. cruzi*. Cada símbolo representa el dato de un individuo.

## 4. DISCUSIÓN

---



*"Tienes que intentar lo imposible para lograr lo posible". Hermann  
Hesse.*

La respuesta inmune desarrollada frente a la infección crónica con *T. cruzi* es el producto de una compleja interacción entre el parásito y el hospedero humano. Luego de años de investigación sobre los potenciales mecanismos involucrados en el desarrollo de la sintomatología, así como en la heterogeneidad de sus manifestaciones en los pacientes con la forma crónica, aún hoy en día existe una gran controversia al respecto (Acevedo *et al.*, 2018, Chevillard *et al.*, 2018). Más allá de ello, lo cierto es que este balance es el resultado de un conjunto de factores que intervienen y, en última instancia determinan el curso clínico de la enfermedad. Dilucidar estos mecanismos resulta necesario para llegar a comprender una interrelación tan compleja.

El balance entre la función efectora y regulatoria de distintas células inmunes es crucial en el mantenimiento de un estado de equilibrio tanto en condiciones de salud como frente a una infección en curso. La función inmunosupresora de las células regulatorias a través de la secreción de IL-10 evolucionó como un mecanismo para limitar la respuesta inmune adaptativa patógeno específica y evitar que conduzca en última instancia, al daño en tejidos y órganos (Mege *et al.*, 2006, Couper *et al.*, 2008). Así, las células Breg aparecieron como un nuevo actor en este contexto de lucha constante por mantener el balance inmunológico. En el estado de equilibrio, estas células ayudan a controlar la activación de células efectoras mediante la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, la inducción de apoptosis de las células blanco y la estimulación de células Treg. Sin embargo, cuando estas funciones están comprometidas, comienzan a tener un rol en el desarrollo de enfermedades inflamatorias (Sattler *et al.*, 2012).

Hasta el momento, la caracterización de las células Breg se encontraba inexplorada en el contexto de la EChC, aunque las alteraciones halladas en otras patologías infecciosas y autoinmunes resultan de gran relevancia en el desarrollo y la progresión de las mismas, así como su estudio es de suma importancia para el desarrollo de inmunoterapias específicas (Mauri y Menon, 2017). La presente Tesis doctoral se centró en la identificación de alteraciones fenotípicas en las células Breg de sangre periférica de pacientes con EChC y su posible asociación con la forma clínica presentada, con el fin de determinar el estado inmunoregulatorio de las células B en la infección crónica con *T. cruzi*. De esta manera, se pretende aportar al conocimiento de la contribución de las células B en el curso clínico de la EChC.

#### **4.1 Caracterización *ex vivo* de las células B y B10 en base a la expresión de los marcadores CD24, CD27 y CD38 presentes en CMN de pacientes con las distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas crónica.**

En la presente Tesis, se caracterizó por primera vez el compartimiento de células B y B10 de sangre periférica de pacientes con EChC en función de la expresión de los marcadores CD24, CD27 y CD38, asociados a poblaciones de células B regulatorias. El primer enfoque empleado consistió en el análisis *ex vivo* de las células B y B10 presentes en las CMN de los pacientes sin (grupo G0) o con alteraciones cardíacas (grupo G1) e individuos no infectados (grupo NI) mediante citometría de flujo.

Los resultados *ex vivo* evidenciaron un aumento en la frecuencia de las células B totales, así como de las células B inmaduras transicionales ( $CD24^{high}CD38^{high}$ ) en los pacientes con la forma cardíaca de la EChC. En estudios previos, *Fernández et al., (2014)* evaluaron la distribución fenotípica de las células B de sangre periférica, y demostraron que los pacientes con infección crónica por *T. cruzi* presentan una disminución selectiva del compartimiento B de memoria ( $CD27^+$ ), comprendiendo diferentes subpoblaciones fenotípicas ( $IgM^-IgD^+$ ,  $IgD^-IgM^+$ ,  $IgD^-IgG^+$ ), así como un aumento en la frecuencia de la población B de memoria doble negativa ( $CD27^-IgD^-IgG^+$ ) y  $CD19^+IgM^+CD27^-IgD^+$ , que comprende a las subpoblaciones transicionales y maduras vírgenes. Sin embargo, no encontraron variaciones en la frecuencia de las células B transicionales (definidas como  $CD19^+CD10^+$ ) así como tampoco en el número absoluto de la población  $CD19^+CD10^-$  entre pacientes con EChC e individuos no infectados. De acuerdo con la definición fenotípica establecida por *Kaminski et al., (2012)* y revisada por *Simon et al., (2016)*, las células B transicionales o recién emigradas de la MO se caracterizan por ser  $CD24^{high}CD38^{high}CD10^+$  y luego se dividen en tres estadios, siendo las T1 y T2 también positivas para CD10, mientras que las T3 son  $CD10^-$  y presentan menores niveles de expresión de CD24 y CD38 ( $CD24^{+/low}$ ,  $CD38^{+/low}$ ). Entonces, si comparamos detalladamente el estudio de *Fernández et al., (2014)* y el presente trabajo de Tesis, notamos diferencias en cuanto a los marcadores fenotípicos utilizados para definir a las poblaciones, las condiciones de cultivo (no se estimulan las CMN con PMA/Ionomicina) y la clasificación o agrupamiento de pacientes (son todos pacientes sin manifestaciones clínicas). Es entonces evidente que las condiciones experimentales de ambos trabajos difieren sustancialmente, lo que imposibilita hacer una comparación directa. Sin embargo, es destacable el hecho de que ambos estudios indican que la infección crónica

con *T. cruzi* promueve alteraciones en el compartimiento B de sangre periférica, con predominio de las formas inmaduras y maduras vírgenes sobre las poblaciones de memoria. Nuestros resultados adicionalmente apuntan a una relación entre este fenómeno y el desarrollo de sintomatología cardíaca en los pacientes infectados crónicamente con *T. cruzi*.

Hasta el momento, no se encontraba demostrado en la bibliografía un aumento en la frecuencia de las células B inmaduras transicionales (CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>) de sangre periférica en pacientes con CCC. Sin embargo, cambios en la frecuencia de células B transicionales (CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>) han sido ampliamente reportados en pacientes con inmunodeficiencias (Cuss *et al.*, 2006, Malaspina *et al.*, 2007) y enfermedades autoinmunes (Samuels *et al.*, 2005, Yurasov *et al.*, 2005, Saussine *et al.*, 2012), así como en estadios avanzados de infección con VIH e infección con el VHC (Malaspina *et al.*, 2006, Fang *et al.*, 2020). En algunos casos, este incremento de las células B transicionales se vio asociado con un aumento en los niveles de expresión de BAFF e IL-7, ambas moléculas esenciales para el desarrollo y la maduración de los linfocitos B (Schiemann *et al.*, 2001, Gorelik *et al.*, 2004, Shulga-Morskaya *et al.*, 2004, Corfe y Paige, 2012, Vigolo *et al.*, 2018). En este sentido, estudios en el modelo murino mostraron que la infección con *T. cruzi* induce la secreción de altos niveles de la molécula BAFF y de factores derivados de células mieloides, conduciendo a alteraciones en el desarrollo de las células B hacia el estadio maduro y a respuestas autorreactivas a través de la activación policlonal (Zuniga *et al.*, 2005, Montes *et al.*, 2007, Bermejo *et al.*, 2010, Müller *et al.*, 2018). Sumado a esto, se encontraron alteraciones en IL-7 y su receptor (IL-7R) en pacientes con EChC con cardiopatía severa (Albareda *et al.*, 2015). Si bien los autores de dicho trabajo enfatizan el rol de esta citoquina en el control de la homeostasis de las células T, el aumento de los niveles de IL-7 detectado en el suero de los pacientes con EChC podría estar directamente relacionado con la expansión del compartimiento B transicional observado en el presente trabajo. Adicionalmente, se cree que existe una conexión entre los niveles de células B CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> y la función inmunoregulatoria, lo que se evidencia en el curso clínico favorable de pacientes con enfermedades crónicas inflamatorias y autoinmunes (Anolik *et al.*, 2007). En el contexto de la EChC, nuestros resultados sugieren una relación entre las manifestaciones cardíacas de la enfermedad y la presencia de alteraciones en la frecuencia de las células B transicionales.

La producción de IL-10 constituye al momento, el marcador más general para definir a las células B regulatorias (Menon *et al.*, 2019). Si bien la función principal de las células B10 es mantener la homeostasis del sistema inmune, se sabe que los mecanismos

inmunosupresores de esta población pueden ser gatillados por los mismos microorganismos patógenos, favoreciendo su persistencia en el huésped y contribuyendo a la baja respuesta a las vacunas (Mege *et al.*, 2006, Pan *et al.*, 2017). Dadas las implicancias de la respuesta inflamatoria no controlada en el contexto de la EChC, resulta de sumo interés entender el rol de la población B10 en el balance que se establece entre los mecanismos que tienden al control de la parasitemia, y la patogénesis inflamatoria desencadenada como consecuencia de la respuesta inmune del huésped frente a la infección. Como se mencionó en la Introducción de esta Tesis, el único antecedente en torno al rol de las células B10 en la EChC corresponde al estudio de *Fares et al.*, (2013). En dicho trabajo, los pacientes con EChC presentaron un aumento en la frecuencia de las células B CD1d<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup> productoras de IL-10 en comparación con individuos no infectados. En este trabajo de Tesis, se observó que la frecuencia de células B10 totales y la expresión de IL-10 promedio son similares entre los pacientes con las distintas formas clínicas de la EChC e individuos no infectados, aunque existen alteraciones en la distribución fenotípica basada en los marcadores de superficie CD24, CD27 y CD38 en los pacientes con cardiopatía. Mientras que la frecuencia y la distribución fenotípica de las células B10 entre los individuos no infectados y los pacientes sin alteraciones cardíacas no mostraron diferencias, aquellos pacientes con compromiso cardíaco evidenciaron un incremento en la frecuencia de las células B10 vírgenes (CD24<sup>int</sup>CD38<sup>int</sup>), así como una tendencia al aumento de la frecuencia de las células B10 transicionales. En este punto, es interesante destacar que, si bien la frecuencia de células B10 de memoria no mostró diferencias significativas al comparar los valores obtenidos entre los grupos, sí se encontró una alteración en el balance de linfocitos B10 vírgenes/memoria a favor de la población de linfocitos B10 vírgenes en los pacientes con la forma cardíaca. El cociente del porcentaje B10 vírgenes/B10 memoria fue prácticamente del doble en los pacientes con cardiopatía con respecto a los pacientes sin alteraciones e individuos no infectados. Este resultado estaría sugiriendo que en aquellos pacientes con CCC existe un incremento de células B10 inmaduras transicionales y maduras vírgenes a expensas de una disminución de las células B10 de memoria.

La expansión de las células B y B10 transicionales y B10 vírgenes de sangre periférica podría deberse a alteraciones intrínsecas de estas células o a factores moleculares y/o celulares extrínsecos relacionados con el contexto inmunológico. En relación a este último aspecto, la evidencia indica que la producción de IL-10 en las células B depende tanto del contexto particular de activación como del subtipo de célula B involucrada. Es así como la función regulatoria de las células B10 puede derivar en

distintas modalidades de acuerdo al tipo de célula B que adquiere la capacidad para secretar esta citoquina y de las señales que recibe del medio (Rieger y Bar-Or, 2008). Se postula que las células B10 vírgenes producen IL-10 cuando son estimuladas por proximidad (en inglés *bystander activation*) mediante interacciones que no son antígeno específicas, es decir, por estimulación a través de CD40 en las células T, independientemente de la presencia de señales a través de los receptores TLR o BCR. La producción de IL-10 en las células B10 vírgenes entonces estaría involucrada mayormente en el mantenimiento de la homeostasis inmune y la prevención de las respuestas inflamatorias. Por otro lado, las células B10 de memoria, que se estimulan mediante la señalización combinada a través de CD40 y de los receptores TLR y BCR, tendrían la función de disminuir la inflamación frente a una respuesta inmune adaptativa patógeno-específica o de contribuir a la resolución en el contexto de una patología autoinmune exacerbada (Rieger y Bar-Or, 2008). Teniendo en cuenta esta distinción en cuanto a la función regulatoria de las células B10 vírgenes y de memoria, resulta interesante destacar el desbalance encontrado entre estas dos poblaciones en los pacientes con CCC frente a aquellos pacientes sin alteraciones cardíacas. Una explicación plausible sería considerar que la infección crónica con *T. cruzi* conduce no sólo a una constricción de la población B de memoria (Fernández *et al.*, 2014), sino que además conduce a una generación limitada de células B10 de memoria en aquellos pacientes en los cuales la inflamación crónica conduce al daño cardíaco. En condiciones de homeostasis, las células B10 de memoria contribuirían a través de un sistema de retroalimentación negativa a regular la respuesta inmune local, evitando el daño tisular excesivo. En la CCC, el desbalance de células B10 a favor de la población de células vírgenes indicaría una limitación en las células B10 de estos pacientes en cuanto a la capacidad para suprimir o contener el daño ocasionado por la respuesta inflamatoria exacerbada contra *T. cruzi*. Esta frecuencia disminuida del compartimiento B10 de memoria podría ser una consecuencia directa de la constricción del compartimiento B de memoria generado por la propia infección crónica, al presentar una menor disponibilidad de potenciales células B10 de este subtipo, frente a la mayor reserva de células B vírgenes que pueden diferenciarse a células B10. Sería interesante estudiar si la disminución en las poblaciones B de memoria hallada por Fernández *et al.*, (2014) en pacientes con EChC sin compromiso cardíaco también se observan en pacientes con cardiopatía.

Otra explicación versaría sobre las señales a las que están expuestas las células B en aquellos pacientes con daño cardíaco. Se sabe que algunas moléculas presentes en los



patógenos inducen preferentemente la función regulatoria de las células B, limitando así la patogénesis, mientras que otras activan mayormente la respuesta inmune innata, contribuyendo a la inflamación (Lampropoulou *et al.*, 2008). Por otra parte, es sabido que diversos TRL y en particular TLR9, se expresan de forma constitutiva y en altos niveles en las células B de memoria, mientras que en las células B vírgenes su expresión es inducida mediante la activación a través del BCR (Bernasconi *et al.*, 2003). De hecho, la expresión diferencial de TLR9 correlaciona con el nivel de respuesta a su ligando, el oligonucleótido CpG (Bernasconi *et al.*, 2003). De esta manera, las células B de memoria proliferan y se diferencian a células plasmáticas productoras de anticuerpos en respuesta a CpG, mientras que las células B vírgenes sólo lo hacen cuando simultáneamente reciben estimulación a través del BCR. Esta respuesta diferencial tiene un significado biológico interesante, pues la expresión de TLR inducida por activación del BCR en las células vírgenes previene la activación policlonal en una respuesta primaria, debido a que restringe la estimulación a las células B específicas. Contrariamente, la expresión constitutiva de los TLR en las células B de memoria permite la activación policlonal del compartimiento B de memoria completo (Bernasconi *et al.*, 2003). De igual manera que ocurre con la respuesta humoral, estimulaciones cortas con CpG inducen la diferenciación de células B10 de memoria y transicionales, mientras que estimulaciones más largas con CpG en conjunto con activadores del BCR generan la conversión de células B vírgenes en productoras de IL-10 (Lampropoulou *et al.*, 2008). En la infección con *T. cruzi*, se demostró que los motivos CpG presentes en el genoma del parásito son capaces de activar la vía de señalización a través de TLR9 en las células del sistema inmune innato (Kayama y Takeda, 2010). Esta señalización resulta crucial en el control de la parasitemia y la sobrevida en el modelo murino de infección (Bartholomeu *et al.*, 2008, Gravina *et al.*, 2013). Sin embargo, el rol de la activación de TLR9 por los motivos CpG del parásito no fue explorado en las células B, y tampoco en relación a la inducción de células B10. Podría especularse que factores inducidos por *T. cruzi* alteran el patrón de expresión de TLR9 en las células B de los pacientes con CCC, favoreciendo la generación de células B10 vírgenes en detrimento de las B10 de memoria, contribuyendo de esta manera al daño observado.

En este punto, resulta de interés destacar la correlación positiva hallada entre el título de anticuerpos IgG totales contra *T. cruzi* y el porcentaje de células B10 en los pacientes sin alteraciones cardíacas. Este resultado estaría sugiriendo que mayores niveles de células B10 en sangre periférica de estos pacientes están asociados a una mayor detección de anticuerpos IgG contra *T. cruzi*. Es importante tener en cuenta que

además de la función regulatoria predominante de las células B10, la secreción autócrina de IL-10 por parte de las células B es sumamente importante en el mantenimiento de la respuesta humoral (Heine *et al.*, 2014). En este sentido, en los pacientes sin compromiso cardíaco la presencia de una mayor frecuencia de células B10 circulantes sería indicativo de una mayor respuesta humoral contra *T. cruzi*. Por el contrario, en los pacientes que progresan a la forma sintomática, este balance entre células B10 y respuesta humoral se vería afectado.

Cabe mencionar del análisis fenotípico de las células B10 *ex vivo* la distribución mayoritaria en el compartimiento CD27<sup>+</sup> (memoria) en relación al CD27<sup>-</sup> (vírgenes) tanto en los donantes no infectados como en los pacientes con EChC. Estos datos son similares a otros reportados previamente en sangre periférica de donantes sanos y de pacientes con artritis reumatoidea en condiciones de cultivo sin estímulo (Bankó *et al.*, 2017).

Aunque existen diversas poblaciones fenotípicas secretoras de IL-10 y con capacidad regulatoria, la evidencia disponible sugiere que en sangre periférica humana las células “más eficientes” en la producción de IL-10 son las células B CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> (inmaduras transicionales) y las células CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> (de memoria) (Blair *et al.*, 2010, Iwata *et al.*, 2011, Flores-Borja *et al.*, 2013, Hasan *et al.*, 2019). En este sentido, se evaluó no sólo la frecuencia de las mismas sino, además, que tan enriquecidas en células B10 están dichas poblaciones. El porcentaje de células IL-10<sup>+</sup> dentro de las células B CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> y CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup>, no mostró diferencias significativas entre los grupos, sugiriendo que los pacientes con CCC presentan un fenotipo regulatorio principalmente debido a una expansión del compartimiento CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>, independientemente de la capacidad para producir IL-10.

Si bien no se hallaron alteraciones en la población CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup>, uno de los fenotipos fuertemente secretores de IL-10 (Iwata *et al.*, 2011, Zha *et al.*, 2012, van der Vlugt *et al.*, 2014), el análisis de la expresión de CD24 y CD27 en las células B10 mostró un incremento en la frecuencia de las células B10 CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> en los pacientes con CCC. El significado biológico de este aumento resulta difícil de interpretar dado que hasta el momento no constituye una subpoblación fenotípica de células B caracterizada funcionalmente. No obstante, los estudios que comparan la capacidad de los distintos fenotipos (basados en la expresión de CD24, CD27 y CD38) para producir IL-10 en condiciones *ex vivo* o frente a la estimulación *in vitro*, muestran que la población CD24<sup>low/-</sup>CD27<sup>-</sup> constituye una fracción que esencialmente no produce IL-10 o la produce en cantidades muy inferiores en comparación con los fenotipos CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> o

CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> (Iwata *et al.*, 2011, Hasan *et al.*, 2019). Además, mediante un análisis de *clustering* mostraron que estas poblaciones tienen características fenotípicas diferentes. La población CD24<sup>low</sup>CD27<sup>low</sup> presenta menores niveles de IgM, CD5, CD43 e integrina  $\beta$ 1 en comparación con las otras dos poblaciones (Hasan *et al.*, 2019). Es decir, que los pacientes con CCC presentarían un aumento de IL-10 en un compartimiento de células B que no se caracteriza por expresar grandes cantidades de esta citoquina, y que por otra parte presenta características fenotípicas y funcionales diferentes a las encontradas en aquellas poblaciones que típicamente expresan IL-10. Sería interesante ahondar en las implicancias de esta alteración en el contexto de la CCC. Aspectos relacionados a la capacidad de estas poblaciones para suprimir la respuesta inmune frente a la estimulación *in vitro* serán analizados en la sección siguiente (5.2).

Un estudio llevado a cabo en el modelo murino de EAE demostró que los plasmablastos presentes en los nódulos linfáticos drenantes (dNLs) expresan grandes cantidades de IL-10 frente a la inflamación observada, contribuyendo directamente a disminuir las manifestaciones exacerbadas de esta enfermedad. En ese mismo estudio, los autores mostraron que al diferenciar células B humanas de sangre periférica a plasmablastos *in vitro* con CpG junto con un coctel de citoquinas (IL-2, IL-6 e IFN- $\alpha$ ), se generan dos poblaciones: una CD27<sup>int</sup>CD38<sup>+</sup> y una CD27<sup>high</sup>CD38<sup>+</sup>, siendo las primeras aquellas que producen mayormente IL-10. Al evaluar el fenotipo celular del cual provienen estos plasmablastos CD27<sup>int</sup>CD38<sup>+</sup> secretores de IL-10 y productores de IgM, encontraron que se diferencian de células B inmaduras transicionales y maduras vírgenes, mientras que los plasmablastos CD27<sup>high</sup>CD38<sup>+</sup> se originan a partir de células B de memoria. En síntesis, establecen que los plasmablastos humanos derivados de células B vírgenes y especialmente de células B inmaduras transicionales, son los que producen grandes cantidades de IL-10 (Matsumoto *et al.*, 2014). Estos mismos autores especulan que existe un balance entre los plasmablastos provenientes de células B inmaduras y vírgenes que tendrían una función regulatoria y los plasmablastos derivados de células B de memoria que contribuirían a la autoinmunidad mediante la producción exacerbada de anticuerpos (Matsumoto *et al.*, 2014). Si trasladamos esto al contexto de la EChC y lo asociamos con los resultados hallados en torno al aumento de células B10 vírgenes y transicionales en los pacientes con CCC, podríamos hipotetizar que en estos pacientes predomina la diferenciación a un fenotipo de plasmablastos regulatorios secretores de IL-10, que frente a la respuesta inflamatoria exacerbada contra *T. cruzi*, tienen la función de contribuir a la limitación del daño tisular. Si bien el alcance de nuestro trabajo es

limitado en este sentido, sería interesante analizar la diferenciación *in vitro* a plasmablastos en los pacientes con EChC con y sin cardiopatía.

Otro aspecto a destacar es la contribución de las células B10 en el desarrollo de otra cardiomiopatía similar a la CCC, la cardiomiopatía dilatada idiopática (CDI). La CDI y la CCC se caracterizan por presentar alteraciones cardíacas similares que conducen a la dilatación ventricular, así como un componente autoimune; se detectaron anticuerpos autorreactivos contra antígenos cardíacos en el plasma de los pacientes con CDI (Jane-wit *et al.*, 2007, Cihakova y Rose, 2008). Sin embargo, a diferencia de la CCC, la CDI se caracteriza por miocarditis ausente o muy leve y una fibrosis menos pronunciada (Higuchi *et al.*, 2003). Bajo las mismas condiciones experimentales del presente trabajo de Tesis (CMN estimuladas con PMA + Ionomicina), Guo *et al.*, (2015) mostraron que la frecuencia de células B10 y dentro de éstas las células CD5<sup>+</sup>CD1d<sup>+</sup>, se encuentran aumentadas en los pacientes con CDI con respecto a individuos sin cardiopatía. Podría especularse que, en forma similar a lo observado en la CDI, las alteraciones en las células B10 CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> (transicionales) y CD24<sup>int</sup>CD38<sup>int</sup> (vírgenes) estarían asociadas con los daños cardíacos descritos para ambas patologías.

Finalmente, vale la pena destacar la contribución igualitaria en la producción total de IL-10 por parte de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) y linfocitos B (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) tanto en pacientes con EChC como en individuos no infectados, indicando que el estado inmunoregulatorio en la cohorte de pacientes en estudio esta balanceado entre ambos tipos de células y no se encuentra alterado en los pacientes.

En conjunto estos resultados apoyan la hipótesis de que existen cambios en la distribución fenotípica de las células Breg de sangre periférica en los pacientes con EChC y estas alteraciones tienen una relación directa con la forma clínica presentada. Así, los pacientes con CCC muestran cambios en el balance de subpoblaciones B10 o de subpoblaciones B asociadas con capacidades regulatorias, como lo son las células B transicionales CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>. Por otra parte, se comprobó que, a pesar de los cambios fenotípicos hallados, la capacidad para producir IL-10 en las células B *ex vivo* es la misma en los pacientes con EChC e individuos NI y a su vez, tampoco depende de la forma clínica presentada por los pacientes.

## **4.2 Caracterización de las células B y B10 en base a la expresión de los marcadores CD24, CD27 y CD38 en células B aisladas de pacientes con las distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas crónica frente al estímulo *in vitro*.**

En esta segunda parte, se caracterizó la población de células B y B10 en cultivos de células B aisladas y estimuladas *in vitro* con lisado total de *T. cruzi* de pacientes con EChC e individuos ni infectados. En primer lugar, se evaluó la distribución fenotípica de las células B en base a la expresión de los marcadores asociados a células Breg frente al estímulo con *T. cruzi*. Este análisis mostró que la población CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> aumenta y que la población CD27<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup> disminuye en todos los grupos. A su vez, en los pacientes con EChC, independientemente de la forma clínica se observó una disminución de la población CD24<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>, que no se detectó en los individuos NI. Por otra parte, la frecuencia de la población CD24<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> se vio aumentada y la de la población de B transicionales (CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>) disminuida sólo en los pacientes sin compromiso cardíaco. Es decir, el estímulo con *T. cruzi* altera el patrón de expresión de CD24 y CD38 dentro de las células vírgenes (CD27<sup>-</sup>) y el patrón de expresión de CD24 dentro de las células B de memoria (CD27<sup>+</sup>), sólo en los pacientes sin compromiso cardíaco.

En cuanto a CD24, el estímulo con *T. cruzi* disminuiría la expresión de esta molécula en las células vírgenes (CD27<sup>-</sup>), pero sólo induciría una reducción en las células de memoria (CD27<sup>+</sup>), en los pacientes sin compromiso cardíaco. CD24 es una proteína altamente glicosilada anclada a GPI o presente en los complejos lipídicos (*lipid rafts*) en la membrana plasmática de las células B (Kay *et al.*, 1991). En las células B humanas maduras, la expresión de esta molécula fluctúa a lo largo del ciclo de vida de las mismas hasta que se pierde cuando se diferencian en células plasmáticas. Sanz *et al.*, (2008) identificaron una alta expresión de CD24 en las células CD27<sup>+</sup>, mientras que las CD27<sup>-</sup> presentan baja expresión de dicha molécula. Además, se demostró que la expresión de CD24 está relacionada con el metabolismo energético de las células B a lo largo de su diferenciación y a su vez, este rol difiere entre diferentes subpoblaciones de células B (Mensah *et al.*, 2018). En ensayos *in vitro*, se observó que las células B CD24<sup>-</sup> proliferan más activamente, mientras que las CD24<sup>+</sup> son más tendientes a permanecer en estado de anergia o morir por apoptosis frente a la estimulación (Mensah *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos frente a la estimulación con lisado de *T. cruzi*, podríamos

concluir que los antígenos parasitarios disminuyen la expresión de CD24 en la población de células vírgenes (CD27<sup>-</sup>), que típicamente ya expresan niveles bajos de esta molécula. Además, en los pacientes sin compromiso cardíaco estaría disminuyendo la expresión de CD24 en las células B de memoria. De esta manera, estaría contribuyendo al predominio de células B vírgenes y de memoria CD24<sup>-</sup>, más propensas a proliferar frente a la estimulación y con menos capacidad de permanecer en estado de anergia o sufrir apoptosis frente a señales del medio. El significado funcional de este mecanismo en el contexto de la EChC deberá ser evaluado a fin de entender si tiene un rol protector o dañino en la respuesta de las células B frente a *T. cruzi*.

Sumado a esto, se detectó un aumento de la población CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> y una disminución de las células CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> en ambos grupos de pacientes con EChC con respecto a los individuos no infectados, para las dos condiciones de cultivo (Control o estímulo con *T. cruzi*). Este último hallazgo denota que estas subpoblaciones ya se encuentran alteradas en los pacientes independientemente de la condición de cultivo a la que fueron expuestas las células B aisladas. Un estudio reciente demostró que las poblaciones CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> y CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> a diferencia de la población CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> tienen la capacidad de suprimir la proliferación, la secreción de IFN- $\gamma$  y de IL-17 de células T CD4<sup>+</sup> y que esta capacidad depende de la producción de IL-10 y de la molécula reguladora PD-L1 (Hasan *et al.*, 2019). Contrariamente, otros autores habían demostrado que tanto las células B CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> como las CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> estimuladas con CpG+CD40L durante 24 hs son capaces de suprimir al mismo nivel la expresión de TNF- $\alpha$  en células T CD4<sup>+</sup> en ensayos de co-cultivo y esta supresión fue independiente de IL-10 (Iwata *et al.*, 2011). Si bien la bibliografía muestra resultados contrapuestos, la gran mayoría de las investigaciones apuntan a un rol inmunosupresor sobre las células T predominante en las poblaciones CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> y CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> (Blair *et al.*, 2010, Flores-Borja *et al.*, 2013, Khoder *et al.*, 2014). Esto indica que podrían existir mecanismos a través de los cuales el compartimiento de células B CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> estaría favorecido en detrimento de las subpoblaciones de alta expresión de los marcadores, contribuyendo de esta manera a que la población Breg sea menos funcional en la CCC. Sintetizando estos resultados, podríamos decir que *T. cruzi* induce alteraciones en los marcadores asociados con fenotipos regulatorios en las células B aisladas provenientes de pacientes con EChC y de individuos no infectados. Adicionalmente, existen alteraciones basales (no generadas por el estímulo con *T. cruzi*) en la distribución fenotípica de las células B de los pacientes con EChC en relación a la expresión de CD24 y CD27, dadas por un aumento de la población CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> y una disminución de la población que presenta elevada

expresión de los mismos (CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup>). Estas últimas alteraciones, por el contrario, si están fuertemente asociadas a la condición clínica de los pacientes, pues no se observan en los individuos no infectados. El aumento de la población doble negativa puede asociarse directamente con un efecto generado por *T. cruzi*, dado que la incubación con el lisado del parásito induce aumento de dichas células en los pacientes que de por sí ya presentan una mayor frecuencia, y también en los no infectados. Sin embargo, la disminución de las células B CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> parecería ser un rasgo que no es consecuencia directa de la acción de *T. cruzi* sobre las células B, sino que se genera secundariamente a la infección, probablemente como consecuencia de la respuesta inmune global. En relación a este aspecto, nuestros resultados evidenciaron una mayor frecuencia de células CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> en aquellos pacientes con baja parasitemia (PCR-), lo que sugiere que esta población podría estar relacionada con el control de la parasitemia en la fase crónica de la enfermedad.

La función supresora de las células B CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> en los pacientes con EChC podría ocurrir por medio de otras moléculas o citoquinas. De hecho, esta población está caracterizada por una alta expresión de otras moléculas como PD-L1, TGF- $\beta$ 1 y Granzima B, así como la ectonucleotidasa CD39 (Hasan *et al.*, 2019), que se expresa en células Treg (Gu *et al.*, 2017), en células supresoras de origen mieloide (Li *et al.*, 2017) y también se halló en poblaciones de células Breg (Kaku *et al.*, 2014, Figueiro *et al.*, 2016). Las alteraciones en alguna de estas moléculas regulatorias podrían generar una funcionalidad deficiente en la infección con *T. cruzi* y conducir a la inflamación exacerbada, mecanismo responsable de la patogénesis de la EChC. La actividad de las ectoenzimas CD39/CD73 que hidrolizan adenosina trifosfato (ATP) extracelular a adenosina, es conocida por constituir un mecanismo de inmunoregulación. La remoción de ATP extracelular, una señal típicamente pro-inflamatoria proveniente de células dañadas o apoptóticas, junto con la generación de adenosina que actúa como inhibidor de las células inmunes; en conjunto, reducen la inflamación y modulan la respuesta inmune en curso (Junger, 2011, Burnstock y Boeynaems, 2014, Raczkowski *et al.*, 2018). Diversos estudios han mostrado una relación entre la expresión de CD39/CD73 y la supresión de la respuesta inmune en diversas patologías (Antonioli *et al.*, 2013).

En el contexto de la enfermedad de Chagas, Santos *et al.*, (2009) demostraron que uno de los mecanismos mediante los cuales *T. cruzi* puede evadir la respuesta inmune es mediante la expresión de ectonucleotidasas (de la familia de CD39) que clivan ATP y reducen la respuesta inmune. Otros autores mostraron que un aumento transitorio de CD39/CD73 atenúa la respuesta de macrófagos inflamatorios contra *T. cruzi* y que la

inhibición de CD73 fue beneficiosa en el establecimiento del perfil inflamatorio de macrófagos en el miocardio de ratones con infección aguda por *T. cruzi* (Ponce *et al.*, 2016). Este hallazgo enfatiza el rol de estas moléculas en la modulación de la respuesta inmune local en el miocardio. Asimismo, un estudio reciente mostró que las células Treg de los pacientes con la forma indeterminada expresan mayores niveles de CD39, indicando que esta molécula estaría involucrada en el control de la inflamación en estos pacientes (Damasio *et al.*, 2019). Así como *T. cruzi* expresa moléculas de la familia de CD39 que modulan la respuesta inmune, podría también inducir en las células B de los pacientes el aumento de la expresión de estas ectonucleotidasas o disminuir los fenotipos de células B que típicamente expresan altos niveles de estas enzimas, como la población CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup>, favoreciendo de esta manera la persistencia y contribuyendo a la progresión de la enfermedad.

Finalmente, en cuanto a CD38, observamos que *T. cruzi* induce una reducción de la frecuencia de células vírgenes negativas para este marcador (CD27<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>) en todos los grupos. Si bien es un marcador fuertemente asociado a la activación de las células B, por ser altamente expresado por células B de centro germinal (CG) y células plasmáticas, el significado de la expresión de esta molécula en células B de sangre periférica y las implicancias en la respuesta inmune frente a patógenos se encuentran inexploradas (Glaría y Valledor, 2020).

Al analizar la distribución fenotípica de las células B incubadas con CpG+CD40L, se observó que este estímulo indujo las mismas alteraciones en los pacientes con EChC y en los donantes no infectados para la mayoría de las subpoblaciones evaluadas excepto en las poblaciones que se mencionan a continuación: un aumento de los plasmablastos sólo en los individuos NI, un aumento de las células CD24<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> en los pacientes de los grupos G1 y NI, una disminución de la población CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> sólo en los individuos NI y de la población CD27<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> sólo en los pacientes del grupo G1. Estos resultados muestran que la plasticidad de las células B activadas *in vitro* con un estímulo inespecífico como CpG+CD40L se encuentra asociada al estado clínico del individuo y al entorno inmunológico causado por la infección por *T. cruzi*. Así, al igual que en otros escenarios patológicos (Siewe *et al.*, 2013, Bankó *et al.*, 2017, Jiao *et al.*, 2018), la respuesta frente a nuevos estímulos y/o antígenos dependientes o no de las células T, estará influenciada por las características fenotípicas y funcionales de las células B.

En segundo lugar, se caracterizó la población de células B10. Los resultados mostraron un aumento en la frecuencia de las células B10 totales frente al estímulo con *T.*



*cruzi* tanto en los pacientes con EChC como en los individuos NI, conjuntamente con un aumento de la secreción de IL-10 al sobrenadante de cultivo. La IFM para IL-10 dentro de las B10 sólo dio un aumento significativo en los pacientes sin compromiso cardíaco. Dado que el aumento en la frecuencia de células B10 y liberación de IL-10 al medio se observó tanto en los pacientes como en los donantes no infectados con *T. cruzi*, se podría deducir que no depende de una memoria previa o contacto con los antígenos del parásito, sino que constituye una respuesta de las células B de tipo “innata” frente a estimulaciones cortas (48 hs) con *T. cruzi*. Adicionalmente, teniendo en cuenta que el ensayo se realizó con células B aisladas, esta inducción no vendría asociada a la señalización a través de CD40, sino que se originaría por la activación de RRP en las células B, probablemente del tipo TLR.

Los mecanismos de señalización a través de los TLR que inducen directamente las respuestas del sistema inmune innato se han investigado en gran profundidad. Sin embargo, el control de la respuesta inmune adaptativa a través de los TLR no se encuentra explorado al mismo nivel. En particular, el rol de los TLR en la activación de las células B y la producción de anticuerpos en el modelo murino muestra que la generación de una respuesta humoral dependiente de la colaboración con las células T requiere la activación de los TLR en las células B (Pasare y Medzhitov, 2005). Por otro lado, se sabe que prácticamente cualquier célula B puede producir IL-10 dependiendo de las señales que reciba, aunque se desconocen las cascadas de señalización específicas que controlan la producción de IL-10 a través de la activación de los TLR en estas células. Como se mencionó previamente, agonistas de los TLR como CpG (TLR9) y R848 (TLR7/8) son capaces de inducir la producción de IL-10 en las células B. Adicionalmente, se observó que IFN- $\alpha$  es capaz de modular la producción de IL-10 mediada por la activación de TLR7/8. En particular, se observó que esta molécula regula la producción de IL-10 en las células B a través de la señalización vía ERK y STAT3 (Liu *et al.*, 2014). En el contexto de la infección con *T. cruzi* se sabe que el parásito es internalizado por macrófagos y células dendríticas por diferentes mecanismos, y que una vez dentro del fagolisosoma el ADN y ARN contacta con los receptores TLR7 y TLR9. Esta interacción promueve la activación de NF- $\kappa$ B mediante la vía de señalización de Myd88 (Bartholomeu *et al.*, 2008). Tal como ocurre con estas CPA, la activación de TLR7 y TLR9 podría producirse en las células B, promoviendo la producción de IL-10 en las mismas. Podría ocurrir que diferentes antígenos presentes en el lisado de *T. cruzi* al ser reconocidos y endocitados por las células B estén contactando con estos receptores, modulando la producción de IL-10 en las mismas. En este punto, si bien la capacidad de las células B de internalizar al parásito

*in vivo* es un tema que aún genera bastante controversia (Velge *et al.*, 1991, Souza *et al.*, 2004), un trabajo reciente demostró por primera vez que *T. cruzi* es capaz de infectar una línea de células B humanas *in vitro* (Dos Santos *et al.*, 2020), con lo cual podemos suponer que este proceso podría ocurrir también *in vivo* frente a la infección de las células B con el parásito. Es importante también considerar que en las células B existe un mecanismo constante de comunicación cruzada entre la activación de TLR7/9 y la señalización directa a través de la estimulación del BCR. De hecho, se sabe que esta señalización conjunta es esencial en el desarrollo de mecanismos de autorreactividad, promoviendo o disminuyendo la activación de células B potencialmente perjudiciales (Suthers y Sarantopoulos, 2017). En contextos de excesivo daño tisular, la activación de TLR7/9 frente a los ácidos nucleicos endógenos puede verse exacerbada, conduciendo a fenómenos de autoinmunidad (Suthers y Sarantopoulos, 2017). En el contexto de la EChC, la señalización TLR-BCR mediada por determinados antígenos de *T. cruzi* así como por antígenos endógenos producto de la propia respuesta inmune podrían también estar contribuyendo en el desarrollo de mecanismos autorreactivos en los pacientes, así como en la activación de células B10 potencialmente dañinas o disfuncionales.

A propósito de la capacidad de IFN- $\alpha$  de inducir la producción de IL-10 en las células B, se sabe también que esta molécula aumenta la expresión de CD38 en las células B vírgenes (Giordani *et al.*, 2009), y puede inducir la diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos (Jego *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta esto, parecería que las señales a través de los receptores TLR7/9 y su consecuente secreción de IFN- $\alpha$  son esenciales para la generación de plasmablastos regulatorios productores de IL-10. Dado que la señalización a través de TLR7/9 constituye una de las posibles vías a través de las cuales *T. cruzi* induce la activación de las células B, es factible pensar que la infección con *T. cruzi* estaría alterando la generación de plasmablastos regulatorios en los pacientes con EChC, más aun teniendo en cuenta los resultados obtenidos *ex vivo*.

El rol de la IL-10 en las enfermedades infecciosas depende no sólo de las características de la infección y la respuesta inmune desarrollada sino del momento particular en el curso clínico de la infección que se tiene en cuenta (Couper *et al.*, 2008, Dai *et al.*, 2017). Por un lado, al disminuir la respuesta inmune innata y adaptativa puede contribuir con las condiciones favorables para la persistencia del patógeno y la infección crónica. Por otro lado, previene las lesiones inmunopatológicas que se generan como resultado de una respuesta inmune exacerbada (Mege *et al.*, 2006, Couper *et al.*, 2008). En el contexto de la EChC, este control anti-inflamatorio debe estar correctamente balanceado a fin de evitar que la producción de IL-10 no suprima la respuesta inmune

celular necesaria para controlar la parasitemia, pero por otra parte, debe ser suficiente para restringir el establecimiento de la inflamación en la fase crónica. Tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad, la parasitemia induce un incremento de IL-10 como parte de un mecanismo de evasión del parásito, lo que hace difícil interpretar si los niveles de IL-10 detectados son causa o consecuencia de la parasitemia en los pacientes (Flávia Nardy *et al.*, 2015, Cardoso *et al.*, 2016). Un estudio reciente en el que se evaluaron los niveles de IL-10 en el suero de pacientes con EChC mostró que aquellos pacientes con parasitemia detectable (PCR+) presentaban mayores niveles de esta citoquina (Salvador *et al.*, 2019). En nuestra cohorte de pacientes, se comparó el porcentaje de células B10 totales, la IFM para IL-10 en estas células y la IL-10 secretada al sobrenadante de las células B, pero no se hallaron diferencias entre aquellos pacientes con parasitemia detectable (PCR+) y no detectable (PCR-), lo que indicaría que no existe una asociación entre el control de la parasitemia y el estado inmunoregulatorio de las células B10 en la cohorte de pacientes en estudio.

Con el fin de evaluar la capacidad de las células B de los pacientes con EChC y de los donantes NI para diferenciarse *in vitro* a células B10, se empleó el estímulo inespecífico con el conocido ligando de TLR9 (CpG) junto con CD40L recombinante. Las células B estimuladas a través del BCR y CD40 (una combinación que simula la estimulación antigénica T-dependiente) proliferan y secretan TNF, IL-6 y otras citoquinas que amplifican la respuesta inmune en curso (Duddy *et al.*, 2004). Contrariamente, la estimulación de CD40 junto con CpG emula las condiciones inflamatorias inducidas por el ADN de los microorganismos o por el ADN liberado de las células dañadas que en presencia de la colaboración de las células T a través de CD40L induciría la producción de IL-10 a modo de suprimir las respuestas inflamatorias exacerbadas (Bankó *et al.*, 2017). Bankó *et al.*, (2017) mostraron bajo las mismas condiciones experimentales que el presente trabajo de Tesis, que la doble estimulación con CpG+CD40L durante 48 hs induce una potente diferenciación de células B10, incluso mayor que aquella observada estimulando las células B sólo con CpG (de un aumento del 5 al 7%). Nuestros resultados frente al estímulo inespecífico mostraron una potente inducción de la diferenciación de células B10 (a nivel de frecuencia de células y de IFM para IL-10), y de la secreción de IL-10 al sobrenadante tanto en los pacientes con EChC como en los individuos no infectados, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, cuando se analizó la magnitud de ese incremento dentro de cada grupo, se pudo observar una capacidad levemente menor en las células B de los pacientes con CCC para diferenciarse a células B10. Contrariamente, en la secreción de IL-10 al sobrenadante se

observó un incremento levemente mayor en los pacientes con alteraciones cardíacas, evidenciando que una vez diferenciadas, la capacidad para liberar IL-10 en los pacientes con CCC permanece intacta e incluso podría estar favorecida con respecto a los pacientes sin alteraciones cardíacas e individuos no infectados.

En este punto es importante destacar que tanto en las condiciones *ex vivo* como en los ensayos *in vitro* con estímulo específico (lisado de *T. cruzi*) e inespecífico (CpG+CD40L), las células B de los pacientes con EChC mostraron la misma capacidad de producir IL-10, independientemente de la condición clínica de los pacientes, evidenciando que al menos en este punto no se encuentra afectada la capacidad regulatoria de las células B. Sin embargo, sería factible como ocurre en otras infecciones y enfermedades autoinmunes que, a pesar de no encontrarse alteradas en su frecuencia, existan deficiencias en la capacidad de esas células B10 para ejercer su función inmunosupresora. Será el objetivo de investigaciones futuras determinar cómo estas células regulan negativamente a otras poblaciones del sistema inmune en el contexto de la EChC.

Una vez analizada la frecuencia de células B10 totales frente al estímulo con *T. cruzi* y frente al estímulo inespecífico, se caracterizó la distribución fenotípica del compartimiento B10 en los pacientes con EChC e individuos no infectados. El análisis frente al estímulo con *T. cruzi* evidenció una disminución en la frecuencia de las células B10 transicionales (CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup>) en los pacientes sin compromiso cardíaco, lo que se asocia con la menor frecuencia de células B transicionales mencionada previamente. A su vez, el estímulo con *T. cruzi* generó en los pacientes con CCC una disminución de la población B10 CD27<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> y un aumento de las poblaciones CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> y CD27<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>. Sintetizando, podemos decir que *T. cruzi* induce la disminución del fenotipo de células B transicionales productoras de IL-10 (CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>IL-10<sup>+</sup>) fuertemente asociado con células Breg, en pacientes sin compromiso cardíaco. Asimismo, induce la disminución de la población B10 CD27<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> y el aumento de poblaciones B10 vírgenes (CD27<sup>-</sup>) en los pacientes con CCC.

El aumento de la población B10 CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> es un rasgo que se identificó en los pacientes con CCC tanto en los ensayos *ex vivo* como en los experimentos *in vitro* frente al estímulo específico con *T. cruzi*, lo que se asocia a su vez con el aumento de las células B CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> hallado *in vitro*. Este último se observó en los pacientes con y sin cardiopatía. Es decir, que dado el aumento general del compartimiento B CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> frente a la infección, aquellos pacientes con CCC presentan un enriquecimiento de las

células B10 dentro de esta población, que no se evidencia en los pacientes sin alteraciones cardíacas. El significado a nivel funcional de este aumento en los pacientes con CCC deberá estudiarse a fin de establecer de qué manera participa este fenotipo en la regulación de la respuesta inmune en el contexto de la cardiopatía.

En cuanto a la distribución fenotípica de las células B10 frente al estímulo con CpG+CD40L, se encontraron las mismas alteraciones en los pacientes con EChC e individuos no infectados. En un estudio que evaluó la población de células Breg en pacientes con CDI en el cual emplearon las mismas condiciones experimentales (48 hs de estímulo con CpG+CD40L y las últimas 5 hs con PIB) observaron que los pacientes presentan una disminución en las células B10 totales en comparación con individuos sanos (Jiao *et al.*, 2018). Si bien nosotros no encontramos diferencias entre los grupos en cuanto al porcentaje de células B10 frente al estímulo con CpG+CD40L, si se observó una leve disminución en el efecto del estímulo en los pacientes con CCC, sugiriendo un comportamiento similar de las células B10 en ambas cardiopatías. Cuando estos mismos autores estudiaron que fenotipo estaba asociado con esa disminución, encontraron que los pacientes con CDI presentaban una menor frecuencia de células B10 dentro del fenotipo CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup>. Además, estas células CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> en los pacientes con CDI presentaron una menor capacidad de suprimir la producción de TNF- $\alpha$  en células T CD4<sup>+</sup> efectoras y de promover la diferenciación de células Treg. Lo que es aún más interesante es que la frecuencia de células B10 correlacionó con parámetros de funcionalidad cardíaca en los pacientes, sugiriendo la contribución de estas células en la severidad del daño cardíaco y la progresión de la CDI (Jiao *et al.*, 2018). En nuestra cohorte de pacientes con CCC, la frecuencia de células B10 CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> fue similar a la de los individuos no infectados frente al estímulo con CpG+CD40L (disminuyen con respecto al control en ambos grupos). No obstante, como se mencionó previamente, existe una disminución en los pacientes con EChC en la población CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup>, lo que sugiere que este fenotipo, independientemente de la producción de IL-10, podría estar involucrado en la progresión de la cardiopatía, así como ocurre en el caso de la CDI.

Finalmente, el análisis de la secreción de IL-17 al sobrenadante de cultivo de las células B mostró mayores niveles de esta citoquina frente al estímulo con *T. cruzi* en los pacientes con cardiopatía. Estudios en el modelo de infección experimental con *T. cruzi* y en artritis reumatoidea han reconocido a las células B como fuente importante de IL-17, aunque el fenotipo específico de estas células todavía no fue identificado (Bermejo *et al.*, 2010, Schlegel *et al.*, 2013). Adicionalmente, se cree que existe una interacción entre BAFF e IL-17 en la regulación de la diferenciación y la función de las células B en artritis,

lo que también podría ocurrir en la CCC (Schlegel *et al.*, 2013). Asimismo, los trabajos que evaluaron IL-17 en pacientes infectados con *T. cruzi* sugieren una función inmunomodulatoria protectora de esta citoquina para prevenir el daño cardíaco en la EChC (Vesely *et al.*, 2020). Los pacientes con cardiopatía presentan menores niveles de IL-17 en linfocitos totales y menor frecuencia de células Th17 que los pacientes sin alteraciones cardíacas. A su vez, los niveles de IL-17 correlacionan positivamente con una mejor función cardíaca (Magalhães *et al.*, 2013, Sousa *et al.*, 2017). Nuestros resultados apuntan entonces a una función protectora de las células productoras de IL-17 (B17) en aquellos pacientes con CCC. Si bien no es posible determinar el fenotipo de las células B secretoras de esta citoquina, los resultados sugieren que los pacientes con CCC podrían poseer mecanismos regulatorios a través de células B17.

En conjunto los resultados en células B aisladas *in vitro* sugieren que *T. cruzi* induce cambios en el patrón de expresión de CD24 y CD38 en las células B vírgenes y de CD24 en las células B de memoria. A su vez, el estímulo con *T. cruzi* genera la diferenciación de células Breg productoras de IL-10 en pacientes con EChC y en individuos no infectados, es decir que no depende de la memoria pre-existente frente a la infección. Este aumento en las células B10 totales en los pacientes con CCC estaría asociado mayormente con el incremento de poblaciones B10 CD27<sup>-</sup> (vírgenes), mientras que en los pacientes sin alteraciones cardíacas y en los donantes no infectados, estaría dado por poblaciones fenotípicas diferentes a las analizadas en este trabajo de Tesis o por un aumento equitativamente distribuido entre las distintas poblaciones evaluadas. A su vez, los pacientes con EChC presentan una disminución de la población Breg CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup> y un aumento de la población CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> que podría tener una contribución en la patogénesis de la CCC.

### **4.3. Estudio de la expresión de la molécula reguladora PD-L1 en las células B estimuladas *in vitro* de los pacientes con distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas crónica.**

Las poblaciones de células Breg son conocidas por expresar no sólo IL-10, sino otras moléculas inhibitorias que pueden suprimir las respuestas inflamatorias, entre las cuales se encuentra la molécula PD-L1 (Khan *et al.*, 2015, Ray *et al.*, 2015, Tarique *et al.*, 2018, Zacca *et al.*, 2018). PD-L1 es una molécula supresora, que se expresa constitutivamente en los linfocitos T y B, en las células dendríticas y en monocitos

(Amarnath *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2011). La señalización mediada por el eje PD1/PD-L1 constituye un factor clave en el mantenimiento de la tolerancia periférica (Zacca *et al.*, 2018). Adicionalmente, se observó que las células B PD-L1<sup>+</sup> tienen capacidad supresora sobre células T, y que están disminuidas en pacientes con artritis reumatoidea (Zacca *et al.*, 2018), evidenciando el rol de esta molécula en el control de la inflamación en autoinmunidad. En el contexto de enfermedades infecciosas, se observó un aumento de la expresión de PD-L1 en células Breg de pacientes con lepra inducidas *in vitro* (Tarique *et al.*, 2018).

Este es el primer trabajo que evalúa la expresión de PD-L1 en las células B aisladas de pacientes con infección crónica con *T. cruzi*. Los resultados mostraron que el estímulo con *T. cruzi* induce un aumento de las células PD-L1<sup>+</sup> en los pacientes con EChC, indicando que las células B podrían utilizar mecanismos adicionales a la IL-10 para controlar la infección con *T. cruzi*, como lo es la vía de señalización a través de las moléculas PD1/PD-L1. Además, se demostró que las células B de los pacientes con EChC tienen la misma capacidad de aumentar la expresión de PD-L1 frente a la estimulación inespecífica por CpG+CD40L.

Los únicos hallazgos en relación a las moléculas inhibitorias PD1/PD-L1 en la infección con *T. cruzi* provienen del modelo murino. Recientemente, un estudio de infección crónica en ratón demostró que la interacción de estas moléculas es importante para proteger al corazón del daño causado por la infiltración leucocitaria local (Fonseca *et al.*, 2018). Sin embargo, la expresión de PD-L1 y su implicancia en la función reguladora de las células B se encuentra hasta el momento inexplorada en la EChC. Estudios que ayuden a dilucidar la funcionalidad del aumento de PD-L1 hallado en las células B frente al estímulo con *T. cruzi* serán necesarios para entender el rol que cumple esta molécula en la infección crónica.

A continuación, se presenta un resumen gráfico de los resultados obtenidos.





## 5. CONCLUSIONES

---



*“El motor de la ciencia es la curiosidad con las preguntas constantes: ¿Y eso cómo es? ¿En qué consiste? ¿Cómo funciona? Y lo más fascinante es que cada respuesta trae consigo nuevas preguntas. En eso los científicos le llevamos ventajas a los exploradores, cuando creemos haber llegado a la meta anhelada, nos damos cuenta de que lo más interesante es que hemos planteado nuevos problemas para explorar”. César Milstein.*

-Los pacientes con **CCC** presentan *ex vivo* alteraciones en la **distribución fenotípica** de las células B y B10 presentes en CMN en comparación con pacientes sin CCC y con individuos no infectados. Las alteraciones identificadas en estos pacientes fueron: un aumento en la frecuencia de las células B totales, inmaduras transicionales (**CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>**), B10 vírgenes (**CD24<sup>int</sup>CD38<sup>int</sup>IL-10<sup>+</sup>**) y **B10 CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>**.

-Las alteraciones halladas en los pacientes con CCC sugieren el predominio de **fenotipos regulatorios inmaduros/vírgenes**, así como de fenotipos que no secretan niveles elevados de IL-10 (CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>).

-La frecuencia de células B10 totales (CD19<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>) y los niveles de expresión de IL-10 en las células B *ex vivo* es similar en pacientes con EChC y en individuos no infectados. A su vez, no se hallaron diferencias entre pacientes con y sin cardiopatía.

-El estímulo *in vitro* con *T. cruzi* en células B aisladas induce un cambio en el patrón de expresión de CD24 y CD38 en las células vírgenes (CD27<sup>-</sup>) y de CD24 en las células B de memoria (CD27<sup>+</sup>).

-El estímulo *in vitro* con *T. cruzi* en células B aisladas induce un **fenotipo B regulatorio**, caracterizado por un aumento de las **células B10** totales y de la **secreción de IL-10** al sobrenadante que sería independiente de una respuesta de memoria, observándose tanto en pacientes con EChC como en individuos no infectados. Este aumento en las células B10 podría deberse a la activación de receptores tipo TLR (TLR7/8/9) por el contacto con los antígenos de *T. cruzi*.

-El aumento de **células B10** frente al estímulo *in vitro* con *T. cruzi* estaría dado por células **vírgenes (CD27<sup>-</sup>)** en los pacientes con **CCC**, mientras que en los pacientes sin alteraciones cardíacas y los individuos no infectados no se halló un fenotipo predominante.

-Los pacientes con **EChC** con y sin cardiopatía muestran *per se* un aumento de las células **B CD24<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>** y una disminución de las células **B CD24<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup>** en comparación con donantes no infectados en células B aisladas. Estas últimas podrían estar relacionadas con el control de la parasitemia en la EChC.

-La capacidad de las células B de diferenciarse a células B10 *in vitro* es similar en pacientes con EChC e individuos no infectados, aunque se observa levemente disminuida en pacientes con CCC, mientras que por el contrario la liberación de IL-10 al sobrenadante se observa levemente potenciada en estos pacientes.

-La caracterización fenotípica detallada de las células B y B10 en base a la expresión de CD24, CD27 y CD38 que se realizó en este trabajo de Tesis aporta evidencia acerca del **potencial rol de las células Breg** en la respuesta inmune desarrollada contra *T. cruzi* y su contribución al **curso clínico de la EChC**, estableciendo las bases para estudios posteriores de la funcionalidad de estas poblaciones.

## PERSPECTIVAS

El desarrollo de estudios que profundicen en la funcionalidad de los fenotipos que se hallaron alterados en este trabajo de Tesis resultaría de suma importancia a fin de establecer si estas alteraciones fenotípicas están asociadas a deficiencias en la capacidad regulatoria de las células B en los pacientes con EChC. Siguiendo esta línea, se pretende evaluar la capacidad inmunosupresora de las poblaciones  $CD24^{high}CD38^{high}$  y  $CD24^{high}CD27^{+}$  sobre células T  $CD4^{+}$  y  $CD8^{+}$  en pacientes con EChC e individuos no infectados. Este análisis incluirá la determinación de la proliferación de las células T, así como la expresión de marcadores de activación y secreción de citoquinas en ensayos de depleción de esas poblaciones específicas en el conjunto de las CMN.

Otro aspecto que sería importante analizar en relación a los resultados obtenidos en torno al desbalance de células B10 inmaduras/maduras vírgenes y de memoria es la capacidad de las células B de los pacientes de diferenciarse *in vitro* a plasmablastos regulatorios. Este análisis permitiría identificar si efectivamente en los pacientes con CCC predomina un fenotipo regulatorio de plasmablastos generado a partir de células B inmaduras y vírgenes, a diferencia de los plasmablastos en los pacientes sin compromiso cardíaco en lo que predominarían plasmablastos derivados de células B de memoria y secretores de anticuerpos. Para ello, se proyecta realizar ensayos de selección por citometría de flujo de las distintas poblaciones de plasmablastos y posteriores ensayos de ELISPOT para detección de IL-10 y secreción de anticuerpos.

Es además de interés ampliar la investigación sobre el compartimiento de células B transicionales ( $CD24^{high}CD38^{high}$ ) en los pacientes con CCC. Dados los hallazgos de *Simon et al., (2016)* donde se describen distintas subpoblaciones dentro de las células B  $CD24^{high}CD38^{high}$ , incluyendo poblaciones  $CD27^{-}$  y  $CD27^{+}$  de memoria atípica, sería interesante evaluar que fenotipo dentro del conjunto de las células B transicionales está aumentado en los pacientes con CCC. Asimismo, sería interesante estudiar si el aumento en la frecuencia de células B transicionales *ex vivo* en los pacientes con CCC está relacionado con un aumento de la molécula BAFF y/o IL-7 en las células B de estos pacientes, mediante citometría de flujo y ensayos de ELISA en sobrenadante.

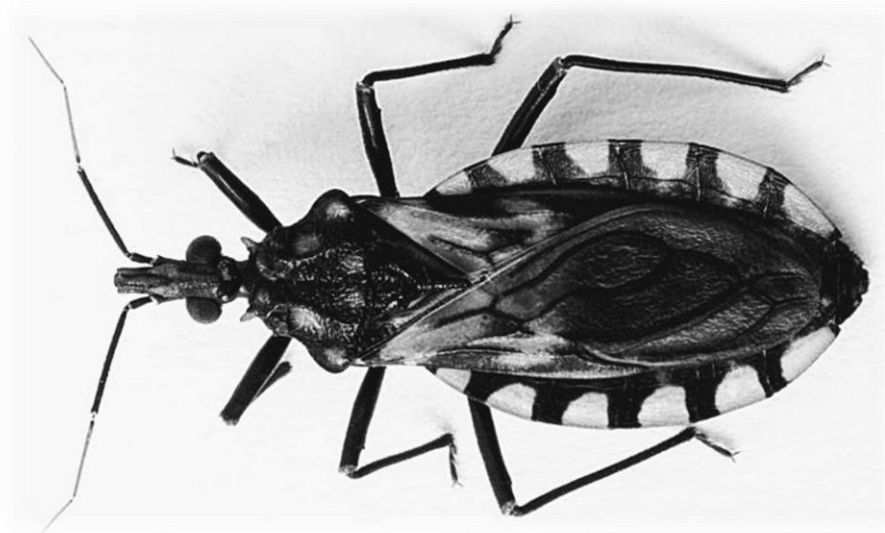
Asimismo, resultaría interesante realizar una caracterización fenotípica de las células B17 en los pacientes con CCC y su potencial contribución como células Breg.

Finalmente, otro aspecto que será objeto de futuras investigaciones en el laboratorio es el aumento de las células  $CD24^{-}CD27^{-}$ . Las características funcionales de

estas células y su relevancia en el contexto de la EChC serán determinadas a fin de dilucidar la importancia de las mismas en el curso clínico de la enfermedad.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---



*“Al examinar la enfermedad, obtenemos sabiduría sobre anatomía, fisiología y biología. Al examinar a la persona con la enfermedad, obtenemos sabiduría sobre la vida”. Oliver Sacks.*

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman and S. Pillai (2014). *Cellular and molecular immunology E-book*, Elsevier Health Sciences.
- Acevedo, G. R., M. C. Girard and K. A. Gomez (2018). "The unsolved jigsaw puzzle of the immune response in Chagas disease." *Frontiers in immunology* 9: 1929.
- Acosta-Serrano, A., C. Hutchinson, E. S. Nakayasu, I. C. Almeida and M. Carrington (2007). "Comparison and evolution of the surface architecture of trypanosomatid parasites." *Trypanosomes After the Genome*. Great Britain: Horizon Bioscience: 319-337.
- Acosta Rodriguez, E., E. Zuniga, C. Montes, M. Merino, D. Bermejo, M. Amezcua Vesely, C. Motran and A. Gruppi (2007). "Trypanosoma cruzi infection beats the B-cell compartment favouring parasite establishment: can we strike first?" *Scandinavian journal of immunology* 66(2-3): 137-142.
- Albareda, M. C., A. M. De Rissio, G. Tomas, A. Serjan, M. G. Alvarez, R. Viotti, L. E. Fichera, M. I. Esteva, D. Potente and A. Armenti (2013). "Polyfunctional T cell responses in children in early stages of chronic Trypanosoma cruzi infection contrast with monofunctional responses of long-term infected adults." *PLoS Negl Trop Dis* 7(12): e2575.
- Albareda, M. C., S. A. Laucella, M. G. Alvarez, A. H. Armenti, G. Bertochi, R. L. Tarleton and M. Postan (2006). "Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients." *International immunology* 18(3): 465-471.
- Albareda, M. C., G. C. Olivera, S. A. Laucella, M. G. Alvarez, E. R. Fernandez, B. Lococo, R. Viotti, R. L. Tarleton and M. Postan (2009). "Chronic human infection with Trypanosoma cruzi drives CD4+ T cells to immune senescence." *The Journal of Immunology* 183(6): 4103-4108.
- Albareda, M. C., D. Perez-Mazliah, M. A. Natale, M. Castro-Eiro, M. G. Alvarez, R. Viotti, G. Bertocchi, B. Lococo, R. L. Tarleton and S. A. Laucella (2015). "Perturbed T cell IL-7 receptor signaling in chronic Chagas disease." *The Journal of Immunology* 194(8): 3883-3889.
- Alcaraz, P. B., M. C. Girard, M. P. Beati, R. Chadi, M. Fernandez, Y. Hernandez, K. A. Gómez and G. R. Acevedo (2019). "CD4+ T cells from chronic Chagas disease patients with different degrees of cardiac compromise exhibit distinct expression patterns of inhibitory receptors TIGIT, Tim-3 and Lag-3." *bioRxiv*: 694729.
- Almeida, S. R., L. S. Aroeira, E. Frymuller, M. Â. A. Dias, C. S. B. Bogsan, J. D. Lopes and M. Mariano (2001). "Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate." *International immunology* 13(9): 1193-1201.
- Alonso-Padilla, J., M. Gallego, A. G. Schijman and J. Gascon (2017). "Molecular diagnostics for Chagas disease: up to date and novel methodologies." *Expert review of molecular diagnostics* 17(7): 699-710.
- Allman, D., R. C. Lindsley, W. DeMuth, K. Rudd, S. A. Shinton and R. R. Hardy (2001). "Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation." *The Journal of Immunology* 167(12): 6834-6840.
- Allman, D. and S. Pillai (2008). "Peripheral B cell subsets." *Current opinion in immunology* 20(2): 149-157.
- Amarnath, S., C. W. Mangus, J. C. Wang, F. Wei, A. He, V. Kapoor, J. E. Foley, P. R. Massey, T. C. Felizardo and J. L. Riley (2011). "The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells." *Science translational medicine* 3(111): 111ra120-111ra120.

- Amezcu Vesely, M. C., D. A. Bermejo, C. L. Montes, E. V. Acosta-Rodríguez and A. Gruppi (2012). "B-cell response during protozoan parasite infections." *Journal of parasitology research* 2012.
- Anderson, A. C., N. Joller and V. K. Kuchroo (2016). "Lag-3, Tim-3, and TIGIT: co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation." *Immunity* 44(5): 989-1004.
- Andrade, D. V., K. J. Gollob and W. O. Dutra (2014). "Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease." *PLoS Negl Trop Dis* 8(7): e3010.
- Andrade, J. P. d., J. A. Marin Neto, A. A. V. d. Paola, F. Vilas-Boas, G. M. M. Oliveira, F. Bacal, E. A. Bocchi, D. R. Almeida, A. A. Fragata Filho and M. d. C. V. Moreira (2011). "I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary." *Arquivos brasileiros de cardiologia* 96(6): 434-442.
- Andreani, G., M. Ouellet, R. Menasria, A. M. Gomez, C. Barat and M. J. Tremblay (2015). "Leishmania infantum amastigotes trigger a subpopulation of human B cells with an immunoregulatory phenotype." *PLoS neglected tropical diseases* 9(2): e0003543.
- Annunziato, F. and S. Romagnani (2009). "Heterogeneity of human effector CD4+ T cells." *Arthritis research & therapy* 11(6): 1-8.
- Anolik, J. H., J. Barnard, T. Owen, B. Zheng, S. Kemsheiti, R. J. Looney and I. Sanz (2007). "Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy." *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology* 56(9): 3044-3056.
- Antonioli, L., P. Pacher, E. S. Vizi and G. Haskó (2013). "CD39 and CD73 in immunity and inflammation." *Trends in molecular medicine* 19(6): 355-367.
- Aravena, O., A. Ferrier, M. Menon, C. Mauri, J. C. Aguillón, L. Soto and D. Catalán (2017). "TIM-1 defines a human regulatory B cell population that is altered in frequency and function in systemic sclerosis patients." *Arthritis research & therapy* 19(1): 8.
- Arnon, T. I., R. M. Horton, I. L. Grigorova and J. G. Cyster (2013). "Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress." *Nature* 493(7434): 684-688.
- Baba, Y., M. Matsumoto and T. Kurosaki (2015). "Signals controlling the development and activity of regulatory B-lineage cells." *International immunology* 27(10): 487-493.
- Bankó, Z., J. Pozsgay, D. Szili, M. Tóth, T. Gáti, G. Nagy, B. Rojkovich and G. Sármay (2017). "Induction and Differentiation of IL-10-Producing Regulatory B Cells from Healthy Blood Donors and Rheumatoid Arthritis Patients." *The Journal of Immunology* 198(4): 1512-1520.
- Bartholomeu, D. C., C. Ropert, M. B. Melo, P. Parroche, C. F. Junqueira, S. M. Teixeira, C. Sirois, P. Kasperkovitz, C. F. Knetter and E. Lien (2008). "Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*." *The Journal of Immunology* 181(2): 1333-1344.
- Bates, D., M. Maechler, B. Bolker, S. Walker, R. Christensen, H. Singmann, B. Dai, G. Grothendieck and P. Green (2010). "lme4: Linear mixed-effects models." R package version 0.999375-37/r1127. R-Forge.
- Batten, M., J. Groom, T. G. Cachero, F. Qian, P. Schneider, J. Tschopp, J. L. Browning and F. Mackay (2000). "BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes." *The Journal of experimental medicine* 192(10): 1453-1466.
- Baumgarth, N. (2017). "A hard (y) look at B-1 cell development and function." *The Journal of Immunology* 199(10): 3387-3394.



- Bergami, P. L., J. Scaglione and M. J. Levin (2001). "Antibodies against the carboxyl-terminal end of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins are pathogenic." *The FASEB Journal* 15(14): 2602-2612.
- Bermejo, D. A., M. C. Amezcua-Vesely, C. L. Montes, M. C. Merino, R. C. Gehrau, H. Cejas, E. V. Acosta-Rodriguez and A. Gruppi (2010). "BAFF mediates splenic B cell response and antibody production in experimental Chagas disease." *PLoS Negl Trop Dis* 4(5): e679.
- Bermejo, D. A., M. C. Amezcua Vesely, M. Khan, E. V. Acosta Rodríguez, C. L. Montes, M. C. Merino, K. M. Toellner, E. Mohr, D. Taylor and A. F. Cunningham (2011). "Trypanosoma cruzi infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies." *Immunology* 132(1): 123-133.
- Bermejo, D. A., S. W. Jackson, M. Gorosito-Serran, E. V. Acosta-Rodriguez, M. C. Amezcua-Vesely, B. D. Sather, A. K. Singh, S. Khim, J. Mucci and D. Liggitt (2013). "Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR $\gamma$ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells." *Nature immunology* 14(5): 514-522.
- Bern, C. (2015). "Chagas' disease." *New England Journal of Medicine* 373(5): 456-466.
- Bernasconi, N. L., N. Onai and A. Lanzavecchia (2003). "A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells." *Blood* 101(11): 4500-4504.
- Bettelli, E., T. Korn, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2008). "Induction and effector functions of TH 17 cells." *Nature* 453(7198): 1051-1057.
- Blair, P. A., L. Y. Noreña, F. Flores-Borja, D. J. Rawlings, D. A. Isenberg, M. R. Ehrenstein and C. Mauri (2010). "CD19+ CD24hiCD38hi B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients." *immunity* 32(1): 129-140.
- Boari, J. T., M. C. A. Vesely, D. A. Bermejo, M. C. Ramello, C. L. Montes, H. Cejas, A. Gruppi and E. V. A. Rodríguez (2012). "IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils." *PLoS Pathog* 8(4): e1002658.
- Bocchi, E. A., R. B. Bestetti, M. I. Scanavacca, E. Cunha Neto and V. S. Issa (2017). "Chronic Chagas heart disease management: from etiology to cardiomyopathy treatment." *Journal of the American College of Cardiology* 70(12): 1510-1524.
- Bonney, K. M. and D. M. Engman (2015). "Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead." *The American journal of pathology* 185(6): 1537-1547.
- Bouaziz, J. D., S. Calbo, M. Maho-Vaillant, A. Saussine, M. Bagot, A. Bensussan and P. Musette (2010). "IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4+ T-cell activation in vitro." *European journal of immunology* 40(10): 2686-2691.
- Bouaziz, J. D., K. Yanaba and T. F. Tedder (2008). "Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation." *Immunological reviews* 224(1): 201-214.
- Brener, Z. and R. T. Gazzinelli (1997). "Immunological Control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease." *International archives of allergy and immunology* 114(2): 103-110.
- Brodskyn, C., J. Patricio, R. Oliveira, L. Lobo, A. Arnholdt, L. Mendonça-Previato, A. Barral and M. Barral-Netto (2002). "Glycoinositolphospholipids from

- Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses." *Infection and immunity* 70(7): 3736-3743.
- Burnstock, G. and J.-M. Boeynaems (2014). "Purinergic signalling and immune cells." *Purinergic signalling* 10(4): 529-564.
- Buscaglia, C. A., V. A. Campo, A. C. Frasch and J. M. Di Noia (2006). "Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity." *Nature Reviews Microbiology* 4(3): 229-236.
- Cardillo, F., E. Postol, J. Nihei, L. S. Aroeira, A. Nomizo and J. Mengel (2007). "B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection." *Immunology* 122(4): 584-595.
- Cardillo, F., J. C. Voltarelli, S. G. Reed and J. S. Silva (1996). "Regulation of Trypanosoma cruzi infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells." *Infection and immunity* 64(1): 128-134.
- Cardoso, M. S., J. L. Reis-Cunha and D. C. Bartholomeu (2016). "Evasion of the immune response by Trypanosoma cruzi during acute infection." *Frontiers in Immunology* 6: 659.
- Carsetti, R., G. Köhler and M. C. Lamers (1995). "Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment." *The Journal of experimental medicine* 181(6): 2129-2140.
- Carsetti, R., M. M. Rosado and H. Wardmann (2004). "Peripheral development of B cells in mouse and man." *Immunological reviews* 197(1): 179-191.
- Carter, N. A., E. C. Rosser and C. Mauri (2012). "Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis." *Arthritis research & therapy* 14(1): 1-9.
- Cihakova, D. and N. R. Rose (2008). "Pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy." *Advances in immunology* 99: 95-114.
- Cobaleda, C., A. Schebesta, A. Delogu and M. Busslinger (2007). "Pax5: the guardian of B cell identity and function." *Nature immunology* 8(5): 463-470.
- Corfe, S. A. and C. J. Paige (2012). The many roles of IL-7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation. *Seminars in immunology*, Elsevier.
- Couper, K. N., D. G. Blount and E. M. Riley (2008). "IL-10: the master regulator of immunity to infection." *The Journal of Immunology* 180(9): 5771-5777.
- Coura, J. R. and J. Borges-Pereira (2010). "Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review." *Acta tropica* 115(1-2): 5-13.
- Coura, J. R. and P. A. Viñas (2010). "Chagas disease: a new worldwide challenge." *Nature* 465(7301): S6-S7.
- Cunha-Neto, E., A. M. Bilate, K. V. Hyland, S. G. Fonseca, J. Kalil, D. M. Engman, E. Cunha-Neto, A. M. Bilate, K. V. Hyland and S. G. Fonseca (2006). "Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry." *Autoimmunity* 39(1): 41-54.
- Cunha-Neto, E., L. G. Nogueira, P. C. Teixeira, R. Ramasawmy, S. A. Drigo, A. C. Goldberg, S. G. Fonseca, A. M. Bilate and J. Kalil (2009). "Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy." *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 252-258.
- Cunha-Neto, E., P. C. Teixeira, S. G. Fonseca, A. M. Bilate and J. Kalil (2011). "Myocardial gene and protein expression profiles after autoimmune injury in Chagas' disease cardiomyopathy." *Autoimmunity reviews* 10(3): 163-165.
- Cunha-Neto E, T. P., Nogueira LG and Kalil J (2011). *Autoimmunity. Chagas Disease: Part B*: 129.

- Cuss, A. K., D. T. Avery, J. L. Cannons, L. J. Yu, K. E. Nichols, P. J. Shaw and S. G. Tangye (2006). "Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity." *The Journal of Immunology* 176(3): 1506-1516.
- Chagas, C. (1909). "Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1(2): 159-218.
- Chaudhuri, J. and F. W. Alt (2004). "Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair." *Nature Reviews Immunology* 4(7): 541-552.
- Chen, L., D. Zeng, H. L. Young, I. Todorov, S. J. Forman, D. Z. Chen, H. F. Johnston and S. James (2011). "Host APCs Augment In Vivo Expansion of donor natural regulatory T cells via B7H1/B7.1 in allogeneic recipients."
- Chevillard, C., J. P. S. Nunes, A. F. Frade, R. R. Almeida, R. P. Pandey, M. S. Nascimento, J. Kalil and E. Cunha-Neto (2018). "Disease tolerance and pathogen resistance genes may underlie *Trypanosoma cruzi* evasion, parasite persistence and differential progression to Chagas disease cardiomyopathy." *Frontiers in immunology* 9: 2791.
- da Rocha, R. F. D. B., I. F. LaRocque-de-Freitas, A. F. Arcanjo, J. Logullo, M. P. Nunes, C. G. Freire-de-Lima and D. Decote-Ricardo (2019). "B-1 cells may drive macrophages susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection." *Frontiers in microbiology* 10: 1598.
- da Silveira, A. B., F. F. de Araújo, M. A. R. Freitas, J. A. S. Gomes, A. T. Chaves, E. C. de Oliveira, S. G. Neto, A. O. Luquetti, G. da Cunha Souza and R. B. Júnior (2009). "Characterization of the presence and distribution of *Foxp3+* cells in chagasic patients with and without megacolon." *Human immunology* 70(1): 65-67.
- Dai, Y. C., J. Zhong and J. F. Xu (2017). "Regulatory B cells in infectious disease." *Molecular medicine reports* 16(1): 3-10.
- Daïen, C. I., S. Gailhac, T. Mura, R. Audo, B. Combe, M. Hahne and J. Morel (2014). "Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity." *Arthritis & rheumatology* 66(8): 2037-2046.
- Damasio, M. P., M. O. Rocha, G. R. Sousa, K. S. Ferreira, R. C. Fares-Gusmão, N. I. Medeiros, F. F. Araujo, A. T. Chaves, W. O. Dutra and R. Correa-Oliveira (2019). "PD1 and PDL1 molecules control suppressor activity of regulatory T cells in chronic Chagas cardiomyopathy patients." *Human immunology* 80(7): 517-522.
- Das, A., G. Ellis, C. Pallant, A. R. Lopes, P. Khanna, D. Peppas, A. Chen, P. Blair, G. Dusheiko and U. Gill (2012). "IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection." *The Journal of Immunology* 189(8): 3925-3935.
- de Alencar, B. C., P. M. Persechini, F. A. Haolla, G. de Oliveira, J. C. Silverio, J. Lannes-Vieira, A. V. Machado, R. T. Gazzinelli, O. Bruna-Romero and M. M. Rodrigues (2009). "Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination." *Infection and immunity* 77(10): 4383-4395.
- De Araujo, F., R. Corrêa-Oliveira, M. O. d. C. Rocha, A. T. Chaves, J. A. Fiuza, R. C. G. Fares, K. S. Ferreira, M. d. C. P. Nunes, T. Keesen and M. P. S. Damasio (2012). "*Foxp3+* CD25<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells from indeterminate patients

- with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity.* Immunobiology 217(8): 768-777.
- de Araujo, F. F., D. M. Vitelli-Avelar, A. Teixeira-Carvalho, P. R. Z. Antas, J. A. S. Gomes, R. Sathler-Avelar, M. O. C. Rocha, S. M. Elói-Santos, R. T. Pinho and R. Correa-Oliveira (2011). "Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease." PLoS Negl Trop Dis 5(5): e992.
- De Bona, E., K. C. F. Lidani, L. Bavia, Z. Omidian, L. H. Gremski, T. L. Sandri and I. J. d. Messias Reason (2018). "Autoimmunity in chronic Chagas disease: a road of multiple pathways to cardiomyopathy?" Frontiers in immunology 9: 1842.
- de Masson, A., J.-D. Bouaziz, H. Le Buanec, M. Robin, A. O'Meara, N. Parquet, M. Rybojad, E. Hau, J.-B. Monfort and M. Branchtein (2015). "CD24<sup>hi</sup>CD27<sup>+</sup> and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease." Blood, The Journal of the American Society of Hematology 125(11): 1830-1839.
- De Oliveira, R. B., L. E. A. Troncon, R. O. Dantas and U. G. Meneghelli (1998). "Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease." The American journal of gastroenterology 93(6): 884-889.
- Dias, J. C. P. (1989). "The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemiological review." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 22(3): 147-156.
- Dorshkind, K. and D. J. Rawlings (2018). B-cell development. Hematology, Elsevier: 210-220.
- Dos Santos, M. A., F. A. Martins, B. C. Borges, J. de Gouveia Santos, R. N. Alves, M. H. Dias, P. C. BrígidoTavares, T. L. Teixeira, C. C. Rodrigues and S. C. Teixeira (2020). "Human B cells infected by Trypanosoma cruzi undergo F-actin disruption and cell death via caspase-7 activation and cleavage of phospholipase C $\gamma$ 1." Immunobiology 225(3): 151904.
- dos Santos Virgilio, F., C. Pontes, M. R. Dominguez, J. Ersching, M. M. Rodrigues and J. R. Vasconcelos (2014). "CD8<sup>+</sup> T cell-mediated immunity during Trypanosoma cruzi infection: a path for vaccine development?" Mediators of inflammation 2014.
- Dubois, F., S. Limou, M. Chesneau, N. Degauque, S. Brouard and R. Danger (2020). "Transcriptional meta-analysis of regulatory B cells." European Journal of Immunology 50(11): 1757-1769.
- Duddy, M. E., A. Alter and A. Bar-Or (2004). "Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation?" The Journal of Immunology 172(6): 3422-3427.
- Duffy, T., C. I. Cura, J. C. Ramirez, T. Abate, N. M. Cayo, R. Parrado, Z. D. Bello, E. Velazquez, A. Muñoz-Calderon and N. A. Juiz (2013). "Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of Trypanosoma cruzi satellite DNA in blood samples." PLoS Negl Trop Dis 7(1): e2000.
- Dutra, W. O. and K. J. Gollob (2008). "Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease." Current opinion in infectious diseases 21(3): 287.
- Dutra, W. O., O. A. Martins-Filho, J. R. Cançado, J. C. Pinto-Dias, Z. Brener, G. L. Freeman Jr, D. G. Colley, G. Gazzinelli and J. C. Parra (1994). "Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease." International immunology 6(4): 499-506.
- Dutra, W. O., C. A. Menezes, L. M. Magalhães and K. J. Gollob (2014). "Immunoregulatory networks in human Chagas disease." Parasite immunology 36(8): 377-387.

- Ehrenstein, M. R. and C. A. Notley (2010). "The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator." *Nature Reviews Immunology* 10(11): 778-786.
- Engman, D. M. and J. S. Leon (2002). "Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity." *Acta tropica* 81(2): 123-132.
- Fang, Q., Y. Deng, R. Liang, Y. Mei, Z. Hu, J. Wang, J. Sun, X. Zhang, J. A. Bellanti and S. G. Zheng (2020). "CD19+ CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> regulatory B cells: a potential immune predictive marker of severity and therapeutic responsiveness of hepatitis C." *American journal of translational research* 12(3): 889.
- Fares, R., R. Correa-Oliveira, F. De Araújo, T. Keesen, A. Chaves, J. Fiuza, K. Ferreira, M. Rocha and J. Gomes (2013). "Identification of phenotypic markers of B cells from patients with Chagas disease." *Parasite immunology* 35(7-8): 214-223.
- Fernández, E. R., G. C. Olivera, L. P. Q. Palacio, M. N. González, Y. Hernandez-Vasquez, N. M. Sirena, M. L. Morán, O. S. L. Patiño and M. Postan (2014). "Altered distribution of peripheral blood memory B cells in humans chronically infected with *Trypanosoma cruzi*." *PloS one* 9(8): e104951.
- Ferreira, V., C. Valck, G. Sánchez, A. Gingras, S. Tzima, M. C. Molina, R. Sim, W. Schwaeble and A. Ferreira (2004). "The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*." *The Journal of Immunology* 172(5): 3042-3050.
- Figueiro, F., L. Muller, S. Funk, E. Jackson, A. Battastini and T. Whiteside (2016). "Phenotypic and functional characteristics of CD39<sup>high</sup> human regulatory B cells (Breg)." *Oncoimmunology* 5(2): e1082703.
- Fillatreau, S., D. Gray and S. M. Anderton (2008). "Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology." *Nature Reviews Immunology* 8(5): 391-397.
- Fillatreau, S., C. H. Sweenie, M. J. McGeachy, D. Gray and S. M. Anderton (2002). "B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10." *Nature immunology* 3(10): 944.
- Finlay, C. M., K. P. Walsh and K. H. Mills (2014). "Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases." *Immunological reviews* 259(1): 206-230.
- Flávia Nardy, A., C. G. Freire-de-Lima and A. Morrot (2015). "Immune evasion strategies of *Trypanosoma cruzi*." *Journal of Immunology Research* 2015.
- Flores-Borja, F., A. Bosma, D. Ng, V. Reddy, M. R. Ehrenstein, D. A. Isenberg and C. Mauri (2013). "CD19+ CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation." *Science translational medicine* 5(173): 173ra123-173ra123.
- Fonseca, R., R. M. Salgado, H. Borges da Silva, R. S. d. Nascimento, M. R. D'Império-Lima and J. M. Alvarez (2018). "Programmed cell death protein 1-PDL1 interaction prevents heart damage in chronic *Trypanosoma cruzi* infection." *Frontiers in immunology* 9: 997.
- Furuzawa-Carballeda, J., G. Lima, P. Simancas, D. Ramos-Bello, M. Simancas, I. C. Bostock, M. Vilatobá, B. Gabilondo, J. Granados and L. Morales-Buenrostro (2012). "Peripheral regulatory cells immunophenotyping in kidney transplant recipients with different clinical profiles: a cross-sectional study." *Journal of transplantation* 2012.
- Gao, W., H. H. Wortis and M. A. Pereira (2002). "The *Trypanosoma cruzi* transsialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion." *International immunology* 14(3): 299-308.
- Garner-Spitzer, E., A. Wagner, M. Paulke-Korinek, H. Kollaritsch, F. X. Heinz, M. Redlberger-Fritz, K. Stiasny, G. F. Fischer, M. Kundi and U. Wiedermann (2013). "Tick-borne encephalitis (TBE) and hepatitis B nonresponders feature

- different immunologic mechanisms in response to TBE and influenza vaccination with involvement of regulatory T and B cells and IL-10.* The Journal of Immunology 191(5): 2426-2436.
- Gazzinelli, R. T. and E. Y. Denkers (2006). "Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism." Nature Reviews Immunology 6(12): 895-906.
- Genestier, L., M. Taillardet, P. Mondiere, H. Gheit, C. Bella and T. Defrance (2007). "TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses." The Journal of Immunology 178(12): 7779-7786.
- Giordani, L., M. Sanchez, I. Libri, M. Quaranta, B. Mattioli and M. Viora (2009). "IFN- $\alpha$  amplifies human naïve B cell TLR-9-mediated activation and Ig production." Journal of leukocyte biology 86(2): 261-271.
- Giorgi, M. E. and R. M. de Lederkremer (2011). "Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite." Carbohydrate research 346(12): 1389-1393.
- Girard, M. C., G. R. Acevedo, L. López, M. S. Ossowski, M. D. Piñeyro, J. P. Grosso, M. Fernandez, Y. Hernandez Vasquez, C. Robello and K. A. Gómez (2018). "Evaluation of the immune response against *Trypanosoma cruzi* cytosolic tryparedoxin peroxidase in human natural infection." Immunology 155(3): 367-378.
- Glaría, E. and A. F. Valledor (2020). "Roles of CD38 in the Immune Response to Infection." Cells 9(1): 228.
- Golgher, D. and R. T. Gazzinelli (2004). "Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease." Autoimmunity 37(5): 399-409.
- Gomes, J., L. Bahia-Oliveira, M. Rocha, O. Martins-Filho, G. Gazzinelli and R. Correa-Oliveira (2003). "Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response." Infection and immunity 71(3): 1185-1193.
- Gomes, J. A., L. M. Bahia-Oliveira, M. O. C. Rocha, S. C. Busek, M. M. Teixeira, J. S. Silva and R. Correa-Oliveira (2005). "Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients." Infection and Immunity 73(12): 7960-7966.
- Gong, Y., C. Zhao, P. Zhao, M. Wang, G. Zhou, F. Han, Y. Cui, J. Qian, H. Zhang and H. Xiong (2015). "Role of IL-10-producing regulatory B cells in chronic hepatitis B virus infection." Digestive diseases and sciences 60(5): 1308-1314.
- Gorelik, L., A. H. Cutler, G. Thill, S. D. Miklasz, D. E. Shea, C. Ambrose, S. A. Bixler, L. Su, M. L. Scott and S. L. Kalled (2004). "Cutting edge: BAFF regulates CD21/35 and CD23 expression independent of its B cell survival function." The Journal of Immunology 172(2): 762-766.
- Gorosito Serran, M., J. Tosello Boari, F. Fiocca Vernengo, C. G. Beccaría, M. C. Ramello, D. A. Bermejo, A. G. Cook, C. G. Vinuesa, C. L. Montes and E. V. Acosta Rodriguez (2017). "Unconventional pro-inflammatory CD4+ T cell response in B Cell-deficient mice infected with *Trypanosoma cruzi*." Frontiers in immunology 8: 1548.
- Grauert, M., M. Houdayer and M. Hontebeyrie-Joskowicz (1993). "Trypanosoma cruzi infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease." Clinical & Experimental Immunology 93(1): 85-92.
- Gravina, H. D., L. Antonelli, R. T. Gazzinelli and C. Ropert (2013). "Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*." PLoS One 8(5): e63100.

- Green, J. A. and J. G. Cyster (2012). "*S1PR2 links germinal center confinement and growth regulation.*" *Immunological reviews* 247(1): 36-51.
- Griffin, D. O., N. E. Holodick and T. L. Rothstein (2011). "*Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-*." *Journal of Experimental Medicine* 208(1): 67-80.
- Gross, J. A., J. Johnston, S. Mudri, R. Enselman, S. R. Dillon, K. Madden, W. Xu, J. Parrish-Novak, D. Foster and C. Lofton-Day (2000). "*TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease.*" *Nature* 404(6781): 995-999.
- Gu, J., X. Ni, X. Pan, H. Lu, Y. Lu, J. Zhao, S. G. Zheng, K. L. Hippen, X. Wang and L. Lu (2017). "*Human CD39 hi regulatory T cells present stronger stability and function under inflammatory conditions.*" *Cellular & molecular immunology* 14(6): 521-528.
- Gu, X. L., H. He, L. Lin, G. X. Luo, Y. F. Wen, D. C. Xiang and J. Qiu (2017). "*Tim-1+ B cells suppress T cell interferon-gamma production and promote Foxp3 expression, but have impaired regulatory function in coronary artery disease.*" *Apmis* 125(10): 872-879.
- Guo, Y., Z. Cen, B. Wei, W. Wu and Q. Zhou (2015). "*Increased circulating interleukin 10-secreting B cells in patients with dilated cardiomyopathy.*" *International journal of clinical and experimental pathology* 8(7): 8107.
- Hardy, R. R. and K. Hayakawa (2001). "*B cell development pathways.*" *Annual review of immunology* 19(1): 595-621.
- Hasan, M. M., L. Thompson-Snipes, G. Klintmalm, A. J. Demetris, J. O'Leary, S. Oh and H. Joo (2019). "*CD24hiCD38hi and CD24hiCD27+ Human Regulatory B Cells Display Common and Distinct Functional Characteristics.*" *The Journal of Immunology* 203(8): 2110-2120.
- Hayakawa, K., R. R. Hardy, D. R. Parks and L. A. Herzenberg (1983). "*The Ly-1 B cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice.*" *The Journal of experimental medicine* 157(1): 202-218.
- He, Y., H. Qian, Y. Liu, L. Duan, Y. Li and G. Shi (2014). "*The roles of regulatory B cells in cancer.*" *Journal of immunology research* 2014.
- Heine, G., G. Drozdenko, J. R. Grün, H. D. Chang, A. Radbruch and M. Worm (2014). "*Autocrine IL-10 promotes human B-cell differentiation into IgM- or IgG-secreting plasmablasts.*" *European journal of immunology* 44(6): 1615-1621.
- Hernandez, H. J., Y. Wang and M. J. Stadecker (1997). "*In infection with Schistosoma mansoni, B cells are required for T helper type 2 cell responses but not for granuloma formation.*" *The Journal of Immunology* 158(10): 4832-4837.
- Higuchi, M. d. L., L. A. Benvenuti, M. Martins Reis and M. Metzger (2003). "*Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments.*" *Cardiovascular research* 60(1): 96-107.
- Hothorn, T., F. Bretz, P. Westfall, R. M. Heiberger, A. Schuetzenmeister and S. Scheibe (2014). "*Multcomp: simultaneous inference in general parametric models.*" R package version: 1.3-2.
- Iwata, Y., T. Matsushita, M. Horikawa, D. J. DiLillo, K. Yanaba, G. M. Venturi, P. M. Szabolcs, S. H. Bernstein, C. M. Magro and A. D. Williams (2011). "*Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells.*" *Blood* 117(2): 530-541.
- Jane-wit, D., C. Z. Altuntas, J. M. Johnson, S. Yong, P. J. Wickley, P. Clark, Q. Wang, Z. B. Popovic, M. S. Penn and D. S. Damron (2007). " *$\beta$ 1-Adrenergic Receptor Autoantibodies Mediate Dilated Cardiomyopathy by Agonistically Inducing Cardiomyocyte Apoptosis.*" *Circulation* 116(4): 399-410.

- Jego, G., A. K. Palucka, J.-P. Blanck, C. Chalouni, V. Pascual and J. Banchereau (2003). "*Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6.*" *Immunity* 19(2): 225-234.
- Jeong, Y.-I., S.-H. Hong, S.-H. Cho, W.-J. Lee and S.-E. Lee (2012). "*Induction of IL-10-producing CD1d high CD5+ regulatory B cells following Babesia microti-infection.*" *PloS one* 7(10): e46553.
- Jeong, Y.-I., S.-H. Hong, S.-H. Cho, M. Y. Park and S.-E. Lee (2016). "*Induction of IL-10-producing regulatory B cells following Toxoplasma gondii infection is important to the cyst formation.*" *Biochemistry and biophysics reports* 7: 91-97.
- Jiao, J., Y.-Z. Lu, N. Xia, Y.-Q. Wang, T.-T. Tang, S.-F. Nie, B.-J. Lv, K.-J. Wang, S. Wen and J.-Y. Li (2018). "*Defective Circulating Regulatory B Cells in Patients with Dilated Cardiomyopathy.*" *Cellular Physiology and Biochemistry* 46(1): 23-35.
- Josefowicz, S. Z., L.-F. Lu and A. Y. Rudensky (2012). "*Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function.*" *Annual review of immunology* 30: 531-564.
- Junger, W. G. (2011). "*Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling.*" *Nature Reviews Immunology* 11(3): 201-212.
- Junqueira, C., B. Caetano, D. C. Bartholomeu, M. B. Melo, C. Ropert, M. M. Rodrigues and R. T. Gazzinelli (2010). "*The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease.*" *Expert reviews in molecular medicine* 12.
- Kaku, H., K. F. Cheng, Y. Al-Abed and T. L. Rothstein (2014). "*A novel mechanism of B cell-mediated immune suppression through CD73 expression and adenosine production.*" *The Journal of Immunology* 193(12): 5904-5913.
- Kalampokis, I., A. Yoshizaki and T. F. Tedder (2013). "*IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease.*" *Arthritis research & therapy* 15(1): 1-12.
- Kaminski, D. A., C. Wei, Y. Qian, A. F. Rosenberg and I. Sanz (2012). "*Advances in human B cell phenotypic profiling.*" *Frontiers in immunology* 3: 302.
- Kantor, A. B. (1991). "*The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells).*" *Immunology today* 12(11): 389-391.
- Karim, M. R. and Y.-F. Wang (2018). "*Phenotypic identification of CD19+ CD5+ CD1d+ regulatory B cells that produce interleukin 10 and transforming growth factor  $\beta$ 1 in human peripheral blood.*" *Archives of Medical Science* 14(1).
- Kay, R., P. Rosten and R. Humphries (1991). "*CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor.*" *The Journal of Immunology* 147(4): 1412-1416.
- Kayama, H. and K. Takeda (2010). "*The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection.*" *Microbes and infection* 12(7): 511-517.
- Kerfoot, S. M., G. Yaari, J. R. Patel, K. L. Johnson, D. G. Gonzalez, S. H. Kleinstein and A. M. Haberman (2011). "*Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone.*" *Immunity* 34(6): 947-960.
- Khan, A. R., E. Hams, A. Floudas, T. Sparwasser, C. T. Weaver and P. G. Fallon (2015). "*PD-L1 hi B cells are critical regulators of humoral immunity.*" *Nature communications* 6(1): 1-16.
- Khoder, A., A. Sarvaria, A. Alsuliman, C. Chew, T. Sekine, N. Cooper, S. Mielke, H. De Lavallade, M. Muftuoglu and I. Fernandez Curbelo (2014). "*Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD.*" *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 124(13): 2034-2045.



- Kierszenbaum, F. (2007). "Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease." *Acta Parasitologica* 52(1): 1-12.
- Klinker, M. W. and S. K. Lundy (2012). "Multiple mechanisms of immune suppression by B lymphocytes." *Molecular medicine* 18(1): 123-137.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 Cells." *Annual review of immunology* 27: 485-517.
- Kumar, S. and R. L. Tarleton (1998). "The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*." *Parasite immunology* 20(5): 207-216.
- Lampropoulou, V., K. Hoehlig, T. Roch, P. Neves, E. C. Gómez, C. H. Sweeney, Y. Hao, A. A. Freitas, U. Steinhoff and S. M. Anderton (2008). "TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity." *The Journal of Immunology* 180(7): 4763-4773.
- Landolt-Marticorena, C., R. Wither, H. Reich, A. Herzenberg, J. Scholey, D. D. Gladman, M. B. Urowitz, P. R. Fortin and J. Wither (2011). "Increased expression of B cell activation factor supports the abnormal expansion of transitional B cells in systemic lupus erythematosus." *The Journal of rheumatology* 38(4): 642-651.
- Lasso, P., J. Mateus, P. Pavía, F. Rosas, N. Roa, M. C. Thomas, M. C. López, J. M. González, C. J. Puerta and A. Cuéllar (2015). "Inhibitory receptor expression on CD8+ T cells is linked to functional responses against *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic chagasic patients." *The Journal of Immunology* 195(8): 3748-3758.
- Laucella, S. A., M. Postan, D. Martin, B. H. Fralish, M. C. Albareda, M. G. Alvarez, B. Lococo, G. Barbieri, R. J. Viotti and R. L. Tarleton (2004). "Frequency of interferon- $\gamma$ -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease." *Journal of Infectious Diseases* 189(5): 909-918.
- Lelchuk, R., A. Dalmasso, C. Inglesini, M. Alvarez and J. Cerisola (1970). "Immunoglobulin studies in serum of patients with American trypanosomiasis (Chagas' disease)." *Clinical and experimental immunology* 6(4): 547.
- Leon, J. and D. Engman (2001). "Autoimmunity in Chagas heart disease." *International journal for parasitology* 31(5-6): 555-561.
- Levy, G. V., L. M. Tasso, S. A. Longhi, H. G. Rivello, V. Kytö, P. Saukko, M. J. Levin and K. A. Gómez (2011). "Antibodies against the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins induce apoptosis in HL-1 cardiac cells." *International journal for parasitology* 41(6): 635-644.
- Li, J., L. Wang, X. Chen, L. Li, Y. Li, Y. Ping, L. Huang, D. Yue, Z. Zhang and F. Wang (2017). "CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF- $\beta$ -mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer." *Oncoimmunology* 6(6): e1320011.
- Li, X., H. Zhong, W. Bao, N. Boulad, J. Evangelista, M. A. Haider, J. Bussel and K. Yazdanbakhsh (2012). "Defective regulatory B-cell compartment in patients with immune thrombocytopenia." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 120(16): 3318-3325.
- Lieke, T., C. Steeg, S. Graefe, B. Fleischer and T. Jacobs (2006). "Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts." *Clinical & Experimental Immunology* 145(2): 357-364.
- Lighaam, L. C., P.-P. A. Unger, D. W. Vredevoogd, D. Verhoeven, E. Vermeulen, A. W. Turksma, A. Ten Brinke, T. Rispens and S. M. Van Ham (2018). "In vitro-induced human IL-10+ B cells do not show a subset-defining marker signature

- and plastically co-express IL-10 with pro-inflammatory cytokines.* *Frontiers in immunology* 9: 1913.
- Lin, W., D. Cerny, E. Chua, K. Duan, J. T. J. Yi, N. B. Shadan, J. Lum, M. Maho-Vaillant, F. Zolezzi and S. C. Wong (2014). "*Human regulatory B cells combine phenotypic and genetic hallmarks with a distinct differentiation fate.*" *The Journal of Immunology* 193(5): 2258-2266.
- Liu, B. S., Y. Cao, T. W. Huizinga, D. A. Hafler and R. E. Toes (2014). "*TLR-mediated STAT 3 and ERK activation controls IL-10 secretion by human B cells.*" *European journal of immunology* 44(7): 2121-2129.
- Liu, J., W. Zhan, C. J. Kim, K. Clayton, H. Zhao, E. Lee, J. C. Cao, B. Ziegler, A. Gregor and F. Y. Yue (2014). "*IL-10-producing B cells are induced early in HIV-1 infection and suppress HIV-1-specific T cell responses.*" *PloS one* 9(2): e89236.
- Liu, Y., Y. Chen, Z. Li, Y. Han, Y. Sun, Q. Wang, B. Liu and Z. Su (2013). "*Role of IL-10-producing regulatory B cells in control of cerebral malaria in P lasmodium berghei infected mice.*" *European journal of immunology* 43(11): 2907-2918.
- Liu, Y., L.-s. Cheng, S.-d. Wu, S.-q. Wang, L. Li, W.-m. She, J. Li, J.-y. Wang and W. Jiang (2016). "*IL-10-producing regulatory B-cells suppressed effector T-cells but enhanced regulatory T-cells in chronic HBV infection.*" *Clinical Science* 130(11): 907-919.
- Lo-Man, R. (2011). "*Regulatory B cells control dendritic cell functions.*" *Immunotherapy* 3(4s): 19-20.
- Loder, B. F., B. Mutschler, R. J. Ray, C. J. Paige, P. Sideras, R. Torres, M. C. Lamers and R. Carsetti (1999). "*B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals.*" *The Journal of experimental medicine* 190(1): 75-90.
- Longhi, S. A., A. Atienza, G. P. Prados, A. Buying, V. Balouz, C. A. Buscaglia, R. Santos, L. M. Tasso, R. Bonato and P. Chiale (2014). "*Cytokine production but lack of proliferation in peripheral blood mononuclear cells from chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients in response to T. cruzi ribosomal P proteins.*" *PLoS neglected tropical diseases* 8(6).
- Lund, F. E. and T. D. Randall (2010). "*Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity.*" *Nature Reviews Immunology* 10(4): 236-247.
- Lykken, J. M., K. M. Candando and T. F. Tedder (2015). "*Regulatory B10 cell development and function.*" *International immunology* 27(10): 471-477.
- Mackay, F., S. A. Woodcock, P. Lawton, C. Ambrose, M. Baetscher, P. Schneider, J. Tschopp and J. L. Browning (1999). "*Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations.*" *The Journal of experimental medicine* 190(11): 1697-1710.
- Machado, F. S., W. O. Dutra, L. Esper, K. J. Gollob, M. M. Teixeira, S. M. Factor, L. M. Weiss, F. Nagajyothi, H. B. Tanowitz and N. J. Garg (2012). *Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease.* *Seminars in immunopathology*, Springer.
- Magalhães, L. M., F. N. Villani, M. d. C. P. Nunes, K. J. Gollob, M. O. Rocha and W. O. Dutra (2013). "*High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease.*" *The Journal of infectious diseases* 207(4): 661-665.
- Malaspina, A., S. Moir, D. G. Chaitt, C. A. Rehm, S. Kottlilil, J. Falloon and A. S. Fauci (2007). "*Idiopathic CD4+ T lymphocytopenia is associated with increases in immature/transitional B cells and serum levels of IL-7.*" *Blood* 109(5): 2086-2088.
- Malaspina, A., S. Moir, J. Ho, W. Wang, M. L. Howell, M. A. O'Shea, G. A. Roby, C. A. Rehm, J. M. Mican and T.-W. Chun (2006). "*Appearance of*

- immature/transitional B cells in HIV-infected individuals with advanced disease: correlation with increased IL-7.* Proceedings of the National Academy of Sciences 103(7): 2262-2267.
- Marin-Neto, J. A., E. Cunha-Neto, B. C. Maciel and M. V. Simões (2007). "Pathogenesis of chronic Chagas heart disease." *Circulation* 115(9): 1109-1123.
- Matsuda, N. M., S. M. Miller and P. R. B. Evora (2009). "The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease." *Clinics* 64(12): 1219-1224.
- Matsumoto, M., A. Baba, T. Yokota, H. Nishikawa, Y. Ohkawa, H. Kayama, A. Kallies, S. L. Nutt, S. Sakaguchi and K. Takeda (2014). "Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation." *Immunity* 41(6): 1040-1051.
- Mauri, C. and A. Bosma (2012). "Immune regulatory function of B cells." *Annual review of immunology* 30: 221-241.
- Mauri, C. and M. R. Ehrenstein (2008). "The 'short' history of regulatory B cells." *Trends in immunology* 29(1): 34-40.
- Mauri, C. and M. Menon (2015). "The expanding family of regulatory B cells." *International immunology* 27(10): 479-486.
- Mauri, C. and M. Menon (2017). "Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential." *The Journal of clinical investigation* 127(3): 772-779.
- Mege, J.-L., S. Meghari, A. Honstetter, C. Capo and D. Raoult (2006). "The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases." *The Lancet infectious diseases* 6(9): 557-569.
- Menon, M., E. C. Rosser and C. Mauri (2019). *Identification and Isolation of Regulatory B Cells in Mouse and Human*. Immunological Tolerance, Springer: 55-66.
- Mensah, F. F., C. W. Armstrong, V. Reddy, A. S. Bansal, S. Berkovitz, M. J. Leandro and G. Cambridge (2018). "CD24 expression and B cell maturation shows a novel link with energy metabolism: potential implications for patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome." *Frontiers in immunology* 9: 2421.
- Merino, M. C., C. L. Montes, E. V. Acosta-Rodriguez, D. A. Bermejo, M. C. Amezcua-Vesely and A. Gruppi (2010). "Peritoneum from *Trypanosoma cruzi*-infected mice is a homing site of *Syndecan-1*neg plasma cells which mainly provide non-parasite-specific antibodies." *International immunology* 22(5): 399-410.
- Minoprio, P., A. Bandeira, P. Pereira, T. M. Santos and A. Coutinho (1989). "Preferential expansion of Ly-1 B and CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection." *International Immunology* 1(2): 176-184.
- Minoprio, P., O. Burlen, P. Pereira, B. Guilbert, L. Andrade, M. Hontebeyrie-Joskowicz and A. Coutinho (1988). "Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity." *Scandinavian journal of immunology* 28(5): 553-561.
- Minoprio, P., A. Coutinho, S. Spinella and M. Hontebeyrie-Joskowicz (1991). "Xid immunodeficiency imparts increased parasite clearance and resistance to pathology in experimental Chagas' disease." *International Immunology* 3(5): 427-433.
- Minoprio, P., M. C. El Cheikh, E. Murphy, M. Hontebeyrie-Joskowicz, R. Coffman, A. Coutinho and A. O'garra (1993). "Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent." *The Journal of Immunology* 151(8): 4200-4208.
- Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, H. Takedatsu, R. S. Blumberg and A. K. Bhan (2002). "Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation." *Immunity* 16(2): 219-230.

- Moir, S. and A. S. Fauci (2009). "B cells in HIV infection and disease." *Nature Reviews Immunology* 9(4): 235-245.
- Montecino-Rodriguez, E. and K. Dorshkind (2012). "B-1 B cell development in the fetus and adult." *Immunity* 36(1): 13-21.
- Montecino-Rodriguez, E., M. Fice, D. Casero, B. Berent-Maoz, C. L. Barber and K. Dorshkind (2016). "Distinct genetic networks orchestrate the emergence of specific waves of fetal and adult B-1 and B-2 development." *Immunity* 45(3): 527-539.
- Montes, C. L., E. V. Acosta-Rodríguez, M. C. Merino, D. A. Bermejo and A. Gruppi (2007). "Polyclonal B cell activation in infections: infectious agents' devilry or defense mechanism of the host?" *Journal of leukocyte biology* 82(5): 1027-1032.
- Montes, C. L., E. V. Acosta-Rodríguez, J. Mucci, E. I. Zuniga, O. Campetella and A. Gruppi (2006). "A *Trypanosoma cruzi* antigen signals CD11b+ cells to secrete cytokines that promote polyclonal B cell proliferation and differentiation into antibody-secreting cells." *European journal of immunology* 36(6): 1474-1485.
- Moore, P. A., O. Belvedere, A. Orr, K. Pieri, D. W. LaFleur, P. Feng, D. Soppet, M. Charters, R. Gentz and D. Parmelee (1999). "BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator." *Science* 285(5425): 260-263.
- Morrot, A., S. R. Villar, F. B. González and A. R. Pérez (2016). "Evasion and immunendocrine regulation in parasite infection: two sides of the same coin in chagas disease?" *Frontiers in microbiology* 7: 704.
- Müller, U., G. A. Schaub, H. Mossmann, G. Köhler, R. Carsetti and C. Hölscher (2018). "Immunosuppression in experimental Chagas disease is mediated by an alteration of bone marrow stromal cell function during the acute phase of infection." *Frontiers in immunology* 9: 2794.
- Murcia, L., B. Carrilero, D. Saura, M. A. Iborra and M. Segovia (2013). "Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas." *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 31: 26-34.
- Murphy, K. and C. Weaver (2016). *Janeway's immunobiology*, Garland science.
- Nduati, E., A. Gwela, H. Karanja, C. Mugenyi, J. Langhorne, K. Marsh and B. C. Urban (2011). "The plasma concentration of the B cell activating factor is increased in children with acute malaria." *Journal of Infectious Diseases* 204(6): 962-970.
- Norris, K. A., B. Bradt, N. R. Cooper and M. So (1991). "Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor." *The Journal of Immunology* 147(7): 2240-2247.
- Noya, B. A. d., G. Pérez-Chacón, Z. Díaz-Bello, S. Dickson, A. Muñoz-Calderón, C. Hernández, Y. Pérez, L. Mauriello and E. Moronta (2017). "Description of an oral Chagas disease outbreak in Venezuela, including a vertically transmitted case." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 112(8): 569-571.
- Nunes, M. C. P., W. Dones, C. A. Morillo, J. J. Encina and A. L. Ribeiro (2013). "Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects." *Journal of the American College of Cardiology* 62(9): 767-776.
- Nutt, S. L., P. D. Hodgkin, D. M. Tarlinton and L. M. Corcoran (2015). "The generation of antibody-secreting plasma cells." *Nature Reviews Immunology* 15(3): 160-171.
- Obukhanych, T. V. and M. C. Nussenzweig (2006). "T-independent type II immune responses generate memory B cells." *The Journal of experimental medicine* 203(2): 305-310.

- Okada, T., M. J. Miller, I. Parker, M. F. Krummel, M. Neighbors, S. B. Hartley, A. O'Garra, M. D. Cahalan and J. G. Cyster (2005). "Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells." *PLoS Biol* 3(6): e150.
- OMS (2002). *Control of Chagas disease: Second report of the WHO Expert Committee*, World Health Organization.
- OMS (2010). "First WHO report on neglected tropical diseases." Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases. Geneva: World Health Organization.
- OMS (2015). "Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates." *Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire* 90(06): 33-44.
- OMS. (2020). "La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana)." from [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
- Ortiz-Ortiz, L., D. E. Parks, M. Rodriguez and W. Weigle (1980). "Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection." *The Journal of Immunology* 124(1): 121-126.
- Ouaissi, A., E. Guilvard, Y. Delneste, G. Caron, G. Magistrelli, N. Herbault, N. Thieblemont and P. Jeannin (2002). "The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection." *The Journal of Immunology* 168(12): 6366-6374.
- Overtvelt, L. V., M. Andrieu, V. Verhasselt, F. Connan, J. Choppin, V. Vercruyssen, M. Goldman, A. Hosmalin and B. Vray (2002). "Trypanosoma cruzi down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8+ T lymphocytes." *International immunology* 14(10): 1135-1144.
- Padilla, A. M., J. M. Bustamante and R. L. Tarleton (2009). "CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection." *Current opinion in immunology* 21(4): 385-390.
- Palanichamy, A., J. Barnard, B. Zheng, T. Owen, T. Quach, C. Wei, R. J. Looney, I. Sanz and J. H. Anolik (2009). "Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy." *The Journal of Immunology* 182(10): 5982-5993.
- Pan, W., W.-T. Hao, Y.-J. Shen, X.-Y. Li, Y.-J. Wang, F.-F. Sun, J.-H. Yin, J. Zhang, R.-X. Tang and J.-P. Cao (2017). "The excretory-secretory products of *Echinococcus granulosus* protoscoleces directly regulate the differentiation of B10, B17 and Th17 cells." *Parasites & vectors* 10(1): 348.
- Papavasiliou, F. N. and D. G. Schatz (2002). "Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity." *Cell* 109(2): S35-S44.
- Pape, K. A., J. J. Taylor, R. W. Maul, P. J. Gearhart and M. K. Jenkins (2011). "Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response." *Science* 331(6021): 1203-1207.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2005). "Control of B-cell responses by Toll-like receptors." *Nature* 438(7066): 364-368.
- Passos, L. S. A., L. M. D. Magalhães, R. P. Soares, A. F. Marques, M. L. R. Alves, R. C. Giunchetti, M. d. C. P. Nunes, K. J. Gollob and W. O. Dutra (2019). "Activation of human CD11b+ B1 B-cells by *Trypanosoma cruzi*-derived proteins is associated with protective immune response in human Chagas disease." *Frontiers in immunology* 9.

- Pereira, K. S., F. L. Schmidt, A. Guaraldo, R. Franco, V. L. Dias and L. A. Passos (2009). "Chagas' disease as a foodborne illness." *Journal of food protection* 72(2): 441-446.
- Pérez-Molina, J. A. and I. Molina (2018). "Chagas disease." *The Lancet* 391(10115): 82-94.
- Phan, T. G., S. Gardam, A. Basten and R. Brink (2005). "Altered migration, recruitment, and somatic hypermutation in the early response of marginal zone B cells to T cell-dependent antigen." *The Journal of Immunology* 174(8): 4567-4578.
- Piacenza, L., M. N. Alvarez, G. Peluffo and R. Radi (2009). "Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection." *Current opinion in microbiology* 12(4): 415-421.
- Piacenza, L., G. Peluffo, M. N. Alvarez, A. Martínez and R. Radi (2013). "*Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease." *Antioxidants & Redox Signaling* 19(7): 723-734.
- Piedras, J., S. Gutierrez, P. A. Reyes-López, K. Reyes, X. López-Karpovitch and V. Monteón (1997). "Circulating lymphocyte subpopulations and activated T and B cells in patients with chagasic and non-chagasic myocardial pathology." *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 30(1): 28-32.
- Pineda, M. A., M. A. McGrath, P. C. Smith, L. Al-Riyami, J. Rzepecka, J. A. Gracie, W. Harnett and M. M. Harnett (2012). "The parasitic helminth product ES-62 suppresses pathogenesis in collagen-induced arthritis by targeting the interleukin-17-producing cellular network at multiple sites." *Arthritis & Rheumatism* 64(10): 3168-3178.
- Pitcovsky, T. A., C. A. Buscaglia, J. Mucci and O. Campetella (2002). "A functional network of intramolecular cross-reacting epitopes delays the elicitation of neutralizing antibodies to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase." *The Journal of infectious diseases* 186(3): 397-404.
- Ponce, N. E., L. M. Sanmarco, N. Eberhardt, M. C. García, H. W. Rivarola, R. C. Cano and M. P. Aoki (2016). "CD73 inhibition shifts cardiac macrophage polarization toward a microbicidal phenotype and ameliorates the outcome of experimental Chagas cardiomyopathy." *The Journal of Immunology* 197(3): 814-823.
- Prata, A. (2001). "Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease." *The Lancet infectious diseases* 1(2): 92-100.
- Raczkowski, F., A. Rissiek, I. Ricklefs, K. Heiss, V. Schumacher, K. Wundenberg, F. Haag, F. Koch-Nolte, E. Tolosa and H.-W. Mittrücker (2018). "CD39 is upregulated during activation of mouse and human T cells and attenuates the immune response to *Listeria monocytogenes*." *PloS one* 13(5): e0197151.
- Ramírez, J. C., C. I. Cura, O. da Cruz Moreira, E. Lages-Silva, N. Juiz, E. Velázquez, J. D. Ramírez, A. Alberti, P. Pavia and M. D. Flores-Chávez (2015). "Analytical validation of quantitative real-time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients." *The Journal of Molecular Diagnostics* 17(5): 605-615.
- Rassi Jr, A., A. Rassi and J. A. Marin-Neto (2010). "Chagas disease." *The Lancet* 375(9723): 1388-1402.
- Ray, A., L. Wang and B. N. Dittel (2015). "IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action." *International immunology* 27(10): 531-536.
- Reina-San-Martin, B., W. Degraeve, C. Rougeot, A. Cosson, N. Chamond, A. Cordeiro-da-Silva, M. Arala-Chaves, A. Coutinho and P. Minoprio (2000). "A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase." *Nature medicine* 6(8): 890-897.

- Ribeiro, A. L., M. P. Nunes, M. M. Teixeira and M. O. Rocha (2012). "Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy." *Nature Reviews Cardiology* 9(10): 576.
- Ribeiro, A. L. P. and M. O. da Costa Rocha (1998). "Indeterminate form of Chagas' disease: considerations about diagnosis and prognosis." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 31(3).
- Rieger, A. and A. Bar-Or (2008). "B-cell-derived interleukin-10 in autoimmune disease: regulating the regulators." *Nature Reviews Immunology* 8(6): 486-487.
- Rodgers, D. T., M. A. Pineda, M. A. McGrath, L. Al-Riyami, W. Harnett and M. M. Harnett (2014). "Protection against collagen-induced arthritis in mice afforded by the parasitic worm product, ES-62, is associated with restoration of the levels of interleukin-10-producing B cells and reduced plasma cell infiltration of the joints." *Immunology* 141(3): 457-466.
- Rodrigues, M. M., B. de Alencar, C. Claser and F. Tzelepis (2009). "Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease?" *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42(3): 220-223.
- Rodrigues, M. M., A. C. Oliveira and M. Bellio (2012). "The immune response to *Trypanosoma cruzi*: role of toll-like receptors and perspectives for vaccine development." *Journal of Parasitology Research* 2012.
- Ronet, C., Y. Hauyon-La Torre, M. Revaz-Breton, B. Mastelic, F. Tacchini-Cottier, J. Louis and P. Launois (2010). "Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production." *The journal of immunology* 184(2): 886-894.
- Rose, N. R. and C. Bona (1993). "Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited)." *Immunology today* 14(9): 426-430.
- Rosenberg, C. S., D. L. Martin and R. L. Tarleton (2010). "CD8+ T cells specific for immunodominant trans-sialidase epitopes contribute to control of *Trypanosoma cruzi* infection but are not required for resistance." *The Journal of Immunology* 185(1): 560-568.
- Rosser, E. C., P. A. Blair and C. Mauri (2014). "Cellular targets of regulatory B cell-mediated suppression." *Molecular immunology* 62(2): 296-304.
- Rosser, E. C. and C. Mauri (2015). "Regulatory B cells: origin, phenotype, and function." *Immunity* 42(4): 607-612.
- Rothstein, T. L., D. O. Griffin, N. E. Holodick, T. D. Quach and H. Kaku (2013). "Human B-1 cells take the stage." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1285: 97.
- Rubin-de-Celis, S. S., H. Uemura, N. Yoshida and S. Schenkman (2006). "Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole." *Cellular microbiology* 8(12): 1888-1898.
- Salvador, F., A. Sánchez-Montalvá, M. Martínez-Gallo, E. Sulleiro, C. Franco-Jarava, A. Sao Avilés, P. Bosch-Nicolau, Z. Moure, A. Silgado and I. Molina (2019). "Serum IL-10 Levels and Its Relationship with Parasitemia in Chronic Chagas Disease Patients." *The American journal of tropical medicine and hygiene* 102(1): 159-163.
- Sallusto, F. (2016). "Heterogeneity of human CD4+ T cells against microbes." *Annual review of immunology* 34: 317-334.
- Samuels, J., Y. S. NG, C. Coupillaud, D. Paget and E. Meffre (2005). "Human B cell tolerance and its failure in rheumatoid arthritis." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1062(1): 116-126.

- Santana, R. A. G., M. G. V. Guerra, D. R. Sousa, K. Couceiro, J. V. Ortiz, M. Oliveira, L. S. Ferreira, K. R. Souza, I. C. Tavares and R. F. Morais (2019). "Oral transmission of *trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon." *Emerging infectious diseases* 25(1): 132.
- Santos, R. F., M. A. Pôssa, M. S. Bastos, P. M. Guedes, M. R. Almeida, R. DeMarco, S. Verjovski-Almeida, M. T. Bahia and J. L. Fietto (2009). "Influence of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence." *PLoS Negl Trop Dis* 3(3): e387.
- Sanz, I., C. Wei, F. E.-H. Lee and J. Anolik (2008). Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Seminars in immunology*, Elsevier.
- Sathler-Avelar, R., E. Lemos, D. Reis, N. Medrano-Mercado, T. Araújo-Jorge, P. Antas, R. Corrêa-Oliveira, A. Teixeira-Carvalho, S. Elói-Santos and D. Favato (2003). "Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*." *Scandinavian journal of immunology* 58(6): 655-663.
- Sattler, S., L. van der Vlugt, L. Hussaarts, H. H. Smits and F.-P. Huang (2012). "Regulatory B cells-implications in autoimmune and allergic disorders." *Recent advances in immunology to target cancer, inflammation and infections*. InTech OA Publishers, Inc: 177-200.
- Saulep-Easton, D., F. B. Vincent, P. S. Quah, A. Wei, S. B. Ting, C. M. Croce, C. Tam and F. Mackay (2016). "The BAFF receptor TACI controls IL-10 production by regulatory B cells and CLL B cells." *Leukemia* 30(1): 163-172.
- Saussine, A., A. Tazi, S. Feuillet, M. Rybojad, C. Juillard, A. Bergeron, V. Dessirier, F. Bouhidel, A. Janin and A. Bensussan (2012). "Active chronic sarcoidosis is characterized by increased transitional blood B cells, increased IL-10-producing regulatory B cells and high BAFF levels." *PloS one* 7(8): e43588.
- Schiemann, B., J. L. Gommerman, K. Vora, T. G. Cachero, S. Shulga-Morskaya, M. Dobles, E. Frew and M. L. Scott (2001). "An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway." *Science* 293(5537): 2111-2114.
- Schijman, A. G., M. Bisio, L. Orellana, M. Sued, T. Duffy, A. M. M. Jaramillo, C. Cura, F. Auter, V. Veron and Y. Qvarnstrom (2011). "International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients." *PLoS Negl Trop Dis* 5(1): e931.
- Schlegel, P. M., I. Steiert, I. Kötter and C. A. Müller (2013). "B cells contribute to heterogeneity of IL-17 producing cells in rheumatoid arthritis and healthy controls." *PloS one* 8(12): e82580.
- Schmunis, G. A. and Z. E. Yadon (2010). "Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem." *Acta tropica* 115(1-2): 14-21.
- Shikanai-Yasuda, M. A. and N. B. Carvalho (2012). "Oral transmission of Chagas disease." *Clinical Infectious Diseases* 54(6): 845-852.
- Shlomchik, M. J. and F. Weisel (2012). "Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells." *Immunological reviews* 247(1): 52-63.
- Shulga-Morskaya, S., M. Dobles, M. E. Walsh, L. G. Ng, F. MacKay, S. P. Rao, S. L. Kalled and M. L. Scott (2004). "B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation." *The Journal of Immunology* 173(4): 2331-2341.
- Siewe, B., J. T. Stapleton, J. Martinson, A. Keshavarzian, N. Kazmi, P. M. Demarais, A. L. French and A. Landay (2013). "Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8+ T cell function *in vitro*." *Journal of leukocyte biology* 93(5): 811-818.



- Simon, Q., J.-O. Pers, D. Cornec, L. Le Pottier, R. A. Mageed and S. Hillion (2016). "In-depth characterization of CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> transitional human B cells reveals different regulatory profiles." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137(5): 1577-1584. e1510.
- Sims, G. P., R. Ettinger, Y. Shirota, C. H. Yarboro, G. G. Illei and P. E. Lipsky (2005). "Identification and characterization of circulating human transitional B cells." *Blood* 105(11): 4390-4398.
- Soares, R. R., L. M. R. Antinarelli, C. Abramo, G. C. Macedo, E. S. Coimbra and K. K. G. Scopel (2017). "What do we know about the role of regulatory B cells (Breg) during the course of infection of two major parasitic diseases, malaria and leishmaniasis?" *Pathogens and global health* 111(3): 107-115.
- Sosoniuk, E., G. Vallejos, H. Kenawy, C. Gaboriaud, N. Thielens, T. Fujita, W. Schwaeble, A. Ferreira and C. Valck (2014). "Trypanosoma cruzi calreticulin inhibits the complement lectin pathway activation by direct interaction with L-Ficolin." *Molecular immunology* 60(1): 80-85.
- Sousa, G. R., J. A. Gomes, M. P. S. Damasio, M. C. P. Nunes, H. S. Costa, N. I. Medeiros, R. C. Fares, A. T. Chaves, R. Corrêa-Oliveira and M. O. C. Rocha (2017). "The role of interleukin 17-mediated immune response in Chagas disease: high level is correlated with better left ventricular function." *PloS one* 12(3): e0172833.
- Souza, P. E., M. O. Rocha, C. A. Menezes, J. S. Coelho, A. C. Chaves, K. J. Gollob and W. O. Dutra (2007). "Trypanosoma cruzi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease." *Infection and immunity* 75(4): 1886-1894.
- Souza, P. E., M. O. Rocha, E. Rocha-Vieira, C. A. Menezes, A. C. Chaves, K. J. Gollob and W. O. Dutra (2004). "Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity." *Infection and immunity* 72(9): 5283-5291.
- Stohl, W. (2002). "B lymphocyte stimulator protein levels in systemic lupus erythematosus and other diseases." *Current rheumatology reports* 4(4): 345-350.
- Suthers, A. N. and S. Sarantopoulos (2017). "TLR7/TLR9-and B cell receptor-signaling crosstalk: promotion of potentially dangerous B cells." *Frontiers in immunology* 8: 775.
- Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." *Cell* 140(6): 805-820.
- Tambourgi, D., T. Kipnis, W. D. da Silva, K. Joiner, A. Sher, S. Heath, B. Hall and G. Ogden (1993). "A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of Trypanosoma cruzi, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF." *Infection and immunity* 61(9): 3656-3663.
- Tarique, M., H. Naz, S. V. Kurra, C. Saini, R. A. Naqvi, R. Rai, M. Suhail, N. Khanna, D. N. Rao and A. Sharma (2018). "Interleukin-10 producing regulatory B cells transformed CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> into Tregs and enhanced regulatory T cells function in human leprosy." *Frontiers in Immunology* 9: 1636.
- Tarleton, R., B. Koller, A. Latour and M. Postan (1992). "Susceptibility of  $\beta$  2-microglobulin-deficient mice to Trypanosoma cruzi infection." *Nature* 356(6367): 338-340.
- Tarleton, R. L. (1990). "Depletion of CD8<sup>+</sup> T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with Trypanosoma cruzi." *The Journal of Immunology* 144(2): 717-724.

- Tarleton, R. L. (2007). "Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*." *Current opinion in immunology* 19(4): 430-434.
- Team, R. C. (2013). "R: A language and environment for statistical computing."
- Tedder, T. F. (2015). "B10 cells: a functionally defined regulatory B cell subset." *The Journal of Immunology* 194(4): 1395-1401.
- Thomas, M. D., B. Srivastava and D. Allman (2006). "Regulation of peripheral B cell maturation." *Cellular immunology* 239(2): 92-102.
- Thorarinsdottir, K., A. Camponeschi, I. Gjertsson and I. L. Mårtensson (2015). "CD 21-/low B cells: A Snapshot of a Unique B Cell Subset in Health and Disease." *Scandinavian journal of immunology* 82(3): 254-261.
- Tibbetts, R. S., T. S. McCormick, E. C. Rowland, S. D. Miller and D. M. Engman (1994). "Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi*-infected mice." *The Journal of Immunology* 152(3): 1493-1499.
- Tobón, G. J., J. H. Izquierdo and C. A. Cañas (2013). "B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity—focus on systemic lupus erythematosus." *Autoimmune diseases* 2013.
- Tyler, K. and D. Engman (2001). "The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited." *International journal for parasitology* 31(5-6): 472-481.
- Tzelepis, F., B. C. de Alencar, M. L. Penido, R. T. Gazzinelli, P. M. Persechini and M. M. Rodrigues (2006). "Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice." *Infection and immunity* 74(4): 2477-2481.
- van de Veen, W., B. Stanic, G. Yaman, M. Wawrzyniak, S. Söllner, D. G. Akdis, B. Rückert, C. A. Akdis and M. Akdis (2013). "IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131(4): 1204-1212.
- van der Vlugt, L. E., E. Mlejnek, A. Ozir-Fazalalikhani, M. Janssen Bonas, T. R. Dijkman, L. A. Labuda, R. Schot, B. Guigas, G. M. Möller and P. S. Hiemstra (2014). "CD 24hi CD 27+ B cells from patients with allergic asthma have impaired regulatory activity in response to lipopolysaccharide." *Clinical & Experimental Allergy* 44(4): 517-528.
- Van Overtvelt, L., N. Vanderheyde, V. Verhasselt, J. Ismaili, L. De Vos, M. Goldman, F. Willems and B. Vray (1999). "*Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules." *Infection and Immunity* 67(8): 4033-4040.
- Velge, P., J. P. Kusnierz, A. Ouaisi, B. Marty, B. N. Pham and A. Capron (1991). "*Trypanosoma cruzi*: Infection of T lymphocytes and their destruction by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity." *European journal of immunology* 21(9): 2145-2152.
- Vesely, M. C. A., C. Rodríguez, A. Gruppi and E. V. A. Rodríguez (2020). "Interleukin-17 mediated immunity during infections with *Trypanosoma cruzi* and other protozoans." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1866(5): 165706.
- Victoria, G. D. and M. C. Nussenzweig (2012). "Germinal centers." *Annual review of immunology* 30: 429-457.
- Vigolo, M., M. G. Chambers, L. Willen, D. Chevalley, K. Maskos, A. Lammens, A. Tardivel, D. Das, C. Kowalczyk-Quintas and S. Schuepbach-Mallepell (2018). "A loop region of BAFF controls B cell survival and regulates recognition by different inhibitors." *Nature communications* 9(1): 1199.

- Viotti, R., C. Vigliano, B. Lococo, M. Petti, G. Bertocchi, M. G. Álvarez and A. Armenti (2005). "Clinical predictors of chronic chagasic myocarditis progression." *Revista Española de Cardiología (English Edition)* 58(9): 1037-1044.
- Vitale, G., F. Mion and C. Pucillo (2010). "Regulatory B cells: evidence, developmental origin and population diversity." *Molecular immunology* 48(1-3): 1-8.
- Vitelli-Avelar, D., R. Sathler-Avelar, J. Dias, V. Pascoal, A. Teixeira-Carvalho, P. Lage, S. Elói-Santos, R. Corrêa-Oliveira and O. Martins-Filho (2005). "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." *Scandinavian journal of immunology* 62(3): 297-308.
- Vlkova, M., O. Ticha, J. Nechvatalova, T. Kalina, J. Litzman, C. Mauri and P. A. Blair (2015). "Regulatory B cells in COVID patients fail to suppress multifunctional IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$ + CD4+ T cells differentiation." *Clinical immunology* 160(2): 292-300.
- Walker, D. M., S. Oghumu, G. Gupta, B. S. McGwire, M. E. Drew and A. R. Satoskar (2014). "Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites." *Cellular and molecular life sciences* 71(7): 1245-1263.
- Wardemann, H., S. Yurasov, A. Schaefer, J. W. Young, E. Meffre and M. C. Nussenzweig (2003). "Predominant autoantibody production by early human B cell precursors." *Science* 301(5638): 1374-1377.
- Weinberg, A., P. Muresan, T. Fenton, K. Richardson, T. Dominguez, A. Bloom, E. Petzold, P. Anthony, C. K. Cunningham and S. A. Spector (2013). "High proportions of regulatory B and T cells are associated with decreased cellular responses to pH1N1 influenza vaccine in HIV-infected children and youth (IMPAACT P1088)." *Human vaccines & immunotherapeutics* 9(5): 957-968.
- Weinkauf, C., R. Salvador and M. PereiraPerrin (2011). "Neurotrophin receptor TrkC is an entry receptor for *Trypanosoma cruzi* in neural, glial, and epithelial cells." *Infection and immunity* 79(10): 4081-4087.
- Wherry, E. J. and M. Kurachi (2015). "Molecular and cellular insights into T cell exhaustion." *Nature Reviews Immunology* 15(8): 486-499.
- Wilde, B., M. Thewissen, J. Damoiseaux, S. Knippenberg, M. Hilhorst, P. Van Paassen, O. Witzke and J. C. Tervaert (2013). "Regulatory B cells in ANCA-associated vasculitis." *Annals of the rheumatic diseases* 72(8): 1416-1419.
- Wortel, C. and S. Heidt (2017). "Regulatory B cells: phenotype, function and role in transplantation." *Transplant immunology* 41: 1-9.
- Yanaba, K., J.-D. Bouaziz, K. M. Haas, J. C. Poe, M. Fujimoto and T. F. Tedder (2008). "A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses." *Immunity* 28(5): 639-650.
- Yanaba, K., J.-D. Bouaziz, T. Matsushita, T. Tsubata and T. F. Tedder (2009). "The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals." *The Journal of Immunology* 182(12): 7459-7472.
- Yang, M., L. Sun, S. Wang, K.-H. Ko, H. Xu, B.-J. Zheng, X. Cao and L. Lu (2010). "Cutting edge: Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-Producing regulatory B cells." *The Journal of Immunology* 184(7): 3321-3325.
- Younès-Chennoufi, A. B., G. Said, H. Eisen, A. Durand and M. Hontebeyrie-Joskowicz (1988). "Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper T cells (CD4+)." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82(1): 84-89.

- Yurasov, S., H. Wardemann, J. Hammersen, M. Tsuiji, E. Meffre, V. Pascual and M. C. Nussenzweig (2005). "Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus." *The Journal of experimental medicine* 201(5): 703-711.
- Zacca, E. R., L. I. Onofrio, C. D. Acosta, P. V. Ferrero, S. M. Alonso, M. C. Ramello, E. Mussano, L. Onetti, I. I. Cadile and M. I. Stancich (2018). "PD-L1+ regulatory B cells are significantly decreased in rheumatoid arthritis patients and increase after successful treatment." *Frontiers in immunology* 9: 2241.
- Zha, B., L. Wang, X. Liu, J. Liu, Z. Chen, J. Xu, L. Sheng, Y. Li and Y. Chu (2012). "Decrease in proportion of CD19+ CD24 hi CD27+ B cells and impairment of their suppressive function in Graves' disease." *PloS one* 7(11): e49835.
- Zhang, J., V. Roschke, K. P. Baker, Z. Wang, G. S. Alarcón, B. J. Fessler, H. Bastian, R. P. Kimberly and T. Zhou (2001). "Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus." *The Journal of Immunology* 166(1): 6-10.
- Zhang, M., G. Zeng, Q. Yang, J. Zhang, X. Zhu, Q. Chen, P. Suthakaran, Y. Zhang, Q. Deng and H. Liu (2014). "Anti-tuberculosis treatment enhances the production of IL-22 through reducing the frequencies of regulatory B cell." *Tuberculosis* 94(3): 238-244.
- Zhang, M., X. Zheng, J. Zhang, Y. Zhu, X. Zhu, H. Liu, M. Zeng, M. W. Graner, B. Zhou and X. Chen (2012). "CD19+ CD1d+ CD5+ B cell frequencies are increased in patients with tuberculosis and suppress Th17 responses." *Cellular immunology* 274(1-2): 89-97.
- Zingales, B., M. A. Miles, D. A. Campbell, M. Tibayrenc, A. M. Macedo, M. M. Teixeira, A. G. Schijman, M. S. Llewellyn, E. Lages-Silva and C. R. Machado (2012). "The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications." *Infection, genetics and evolution* 12(2): 240-253.
- Zuniga, E., E. Acosta-Rodriguez, M. C. Merino, C. Montes and A. Gruppi (2005). "Depletion of immature B cells during *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of myeloid cells and the cyclooxygenase pathway." *European journal of immunology* 35(6): 1849-1858.
- Zuñiga, E., C. C. Motran, C. L. Montes, H. Yagita and A. Gruppi (2002). "*Trypanosoma cruzi* infection selectively renders parasite-specific IgG+ B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide." *The Journal of Immunology* 168(8): 3965-3973.
- Zuñiga, E., G. A. Rabinovich, M. M. Iglesias and A. Gruppi (2001). "Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis." *Journal of leukocyte biology* 70(1): 73-79.

# 7. APÉNDICE

---



*“Lo que sea que estés buscando no va a llegar en la forma que lo esperas”*

*Haruki Murakami.*

Tabla 7.1. Datos clínicos y demográficos detallados de los pacientes incluidos en el estudio *ex vivo*.

Cohorte de pacientes estudio <i>ex vivo</i>					
Código paciente	Edad	Sexo	Kuschnir	PCR	Título IgG anti <i>T. cruzi</i>
<b>Grupo G0 (n=10)</b>					
FA030	43	F	0	Negativa	42.503
FA028	58	M	0	Negativa	5.635
FA018	62	M	0	Negativa	7.682
FA024	70	M	0	Negativa	60.439
FA017	60	F	0	Negativa	37.850
FA008	58	M	0	Negativa	1.778
RM48	55	F	0	Negativa	179
RM42	48	M	0	Negativa	650
RM38	52	F	0	Negativa	17.503
FA035	57	F	0	Negativa	14.267
<b>Grupo G1 (n=10)</b>					
FA013	52	M	1	Positiva	30.318
FA021	67	M	1	Negativa	3.591
FA011	44	F	1	Negativa	12.261
FA025	59	F	1	Negativa	18.240
RM28	74	F	1	Negativa	166
FA007	63	F	1	Negativa	6.084
FA032	52	F	1	Negativa	21.858
PI006	54	M	2	Negativa	2.617
FA002	51	F	1	Negativa	1.523
PI017	61	M	3	Negativa	208
<b>Grupo NI (n=9)</b>					
MP	43	F	NA	NA	< 10
AR	33	M	NA	NA	< 10
LD	60	F	NA	NA	< 10
JF	55	M	NA	NA	< 10
SV	60	F	NA	NA	< 10
ZB	30	F	NA	NA	< 10
DWE	40	M	NA	NA	< 10
SB	61	F	NA	NA	< 10
DW	43	F	NA	NA	< 10

NA: no aplica. Los valores de título de IgG anti-*T. cruzi* corresponden a la reactividad máxima 50 (RM<sub>50</sub>).

Tabla 7.2. Datos clínicos y demográficos detallados de los pacientes incluidos en el estudio *in vitro*.

Cohorte de pacientes estudio <i>in vitro</i>						
Grupo G0 (n=13)						
Código paciente	Edad	Sexo	Kuschnir	PCR	Título IgG anti <i>T. cruzi</i>	
RM42	48	F	0	Negativa	650	
FA061	51	F	0	Positiva	288	
FA048	63	M	0	Positiva	12936	
PI113	64	M	0	Negativa	8994	
PI115	54	F	0	Positiva	22248	
PI119	50	M	0	Positiva	11497	
PI120	41	M	0	Negativa	7569	
PI121	30	F	0	Negativa	21301	
PI123	62	M	0	Negativa	2099	
FA049	54	M	0	Negativa	2135	
FA068	60	F	0	Negativa	1225	
PI127	63	F	0	Positiva	288	
PI128	52	F	0	Negativa	852	
Grupo G1 (n=13)						
FA060	62	F	1	Negativa	13774	
FA062	59	F	1	Negativa	23489	
FA014	58	M	1	Negativa	2919	
PI111	53	F	1	Negativa	6259	
FA064	42	M	1	Positiva	13994	
FA002	55	F	1	Positiva	4982	
FA065	56	M	1	Positiva	12351	
FA066	36	M	1	Positiva	4667	
FA023	70	F	1	Negativa	2065	
FA069	62	M	1	Positiva	33336	
PI084	43	M	3	Negativa	121	
PI124	49	F	1	Negativa	4652	
FA007	63	F	1	Negativa	6084	
Grupo NI (n=13)						
SL	50	F	NA	NA	<10	
PH	53	M	NA	NA	<10	
SB	61	F	NA	NA	<10	
MR	31	F	NA	NA	<10	
MN	50	M	NA	NA	<10	
DWE	40	M	NA	NA	<10	
AR	33	M	NA	NA	<10	
EV	30	M	NA	NA	<10	
JR	44	F	NA	NA	<10	
GH	51	M	NA	NA	<10	
DW	42	F	NA	NA	<10	
VDC	26	F	NA	NA	<10	

---



---

AB	32	M	NA	NA	<10
----	----	---	----	----	-----

---

NA: no aplica. Los valores de título de IgG anti-*T.cruzi* corresponden a la RM<sub>50</sub>.

---

Tabla 7.3. Porcentajes de células B pre- y post-aislamiento en las muestras de los pacientes con EChC y donantes no infectados.

Código paciente	% células B pre-aislamiento	% células B post-aislamiento
<b>Grupo G0</b>		
RM42	7,5	87,7
FA061	8,8	95,7
FA048	13,1	93,4
PI113	7,0	92,9
PI115	17,0	95,8
PI119	18,2	90,6
PI120	10,7	95,0
PI121	15,6	96,0
PI123	10,9	82,6
FA068	34,7	98,8
FA049	6,7	96,0
PI127	11,0	81,9
PI128	15,4	92,2
<b>Grupo G1</b>		
FA060	5,3	93,7
FA062	8,2	93,1
FA014	11,9	86,0
PI111	6,3	93,0
FA064	9,1	91,6
FA002	22,2	94,6
FA065	16,8	91,4
FA066	21,1	96,7
FA023	13,8	89,6
FA069	16,6	97,2
PI084	22,7	79,5
PI124	14,1	90,0
FA007	10,1	89,7
<b>Grupo NI</b>		
SL	5,5	86,6
PH	3,4	82,5
SB	7,6	95,5
MR	9,3	95,0
MN	11,8	95,2
DWE	10,7	94,7
AR	11,6	92,1
EV	13,6	88,0
JR	15,4	94,5
GH	8,3	91,9
DW	14,0	90,8
VDC	14,8	95,9
AB	19,2	91,4



Tabla 7.4. Análisis de la distribución fenotípica de las células B y B10 en los cultivos estimulados con CpG+CD40L en pacientes con EChC e individuos no infectados.

Control vs. CpG+CD40L			
Células B	G0	G1	NI
Transicionales			
Vírgenes			
Memoria	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$
Plasmablastos			$p=0,0032$
CD24 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup>	$p<0,0001$	$p<0,0001$	$p<0,0001$
CD24 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>		$p=0,013$	$p=0,0092$
CD24 <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup>	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$
CD24 <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup>	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$
CD24 <sup>high</sup> CD27 <sup>+</sup>			$p=0,0087$
CD27 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup>			
CD27 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>	$p=0,016$	$p=0,019$	$p=0,0029$
CD27 <sup>-</sup> CD38 <sup>+</sup>		$p=0,012$	
CD27 <sup>-</sup> CD38 <sup>-</sup>			
Células B10	G0	G1	NI
Transicionales	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$
Vírgenes	$p<0,0001$	$p<0,0001$	$p<0,0001$
Memoria	$p<0,0001$	$p<0,0001$	$p<0,0001$
Plasmablastos	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$
CD24 <sup>+</sup> CD27 <sup>-</sup>	$p<0,001$	$p=0,016$	$p<0,001$
CD24 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>	$p<0,0001$	$p<0,0001$	$p<0,0001$
CD24 <sup>-</sup> CD27 <sup>+</sup>			
CD24 <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup>	$p<0,001$	$p<0,001$	$p=0,045$
CD24 <sup>high</sup> CD27 <sup>+</sup>	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$
CD27 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup>	$p<0,0001$	$p<0,0001$	$p<0,0001$
CD27 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>			
CD27 <sup>-</sup> CD38 <sup>+</sup>	$p=0,0032$	$p=0,0042$	
CD27 <sup>-</sup> CD38 <sup>-</sup>	$p=0,0077$	$p=0,020$	$p=0,0031$

Los colores indican el sentido de alteración de las subpoblaciones correspondientes: en rojo se indica un aumento de la frecuencia y en verde una disminución de la misma. El color gris indica que no se observaron cambios significativos en la frecuencia.

Tabla 7.5. Análisis de correlación entre los anticuerpos totales de tipo IgG contra *T. cruzi* presentes en el suero de los pacientes con EChC de la cohorte *in vitro* y la frecuencia de poblaciones B y B10 más relevantes.

Grupo G0			
VARIABLES A CORRELACIONAR	COEFICIENTE R DE SPEARMAN	P VALOR	
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - % B10 totales	0,0138	0,9676	
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - IFM IL-10	0,2448	0,4170	
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - IL-10 (pg/ml)	-0,0303	0,9166	
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - % B CD24 <sup>high</sup> CD27 <sup>+</sup>	0,1503	0,6576	
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - % B CD24 <sup>CD27</sup>	-0,1918	0,5586	
Grupo G1			
VARIABLES A CORRELACIONAR	COEFICIENTE R DE SPEARMAN	P VALOR	
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - % B10 totales	-0,4319	0,1383	
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - IFM IL-10	-0,2308	0,4477	
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - IL-10 (pg/ml)	-0,4670	0,1103	
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - % B CD24 <sup>high</sup> CD27 <sup>+</sup>	-0,0636	0,8603	
Título de IgG total contra <i>T. cruzi</i> - % B CD24 <sup>CD27</sup>	0,0546	0,8812	

Tabla 7. 6. Relación entre algunas de las variables más relevantes estudiadas *in vitro* y la parasitemia en los pacientes (detección de *T. cruzi* por PCR).

Grupo G0			
VARIABLE	PACIENTES CON PCR+ (n=5)	PACIENTES CON PCR- (n=8)	P VALOR
% B10	0,46 (0,36 - 1,11)	0,6 (0,23 - 0,98)	0,6775
IFM IL-10	2.136 (1.303 - 3.065)	2.303 (1.585 - 2.404)	0,8827
pg/ml IL-10 (ELISA)	21,50 (14,20 - 35,41)	26,52 (16,35 - 66,26)	0,7786
% B CD24 <sup>high</sup> CD27 <sup>+</sup>	6,95 (5,87 - 16,2)	17,7 (13,93 - 31,55)	0,1255
% B CD24 <sup>CD27</sup>	8,54 (6,10 - 24,4)	11,9 (7,84 - 13,18)	>0,9999
Grupo G1			
VARIABLE	PACIENTES CON PCR+ (n=5)	PACIENTES CON PCR- (n=8)	P VALOR
% B10	0,12 (0,085 - 1,60)	0,64 (0,31 - 1,25)	0,4584
IFM B10	2.136 (1.303 - 3.065)	3.116 (1.569 - 3.250)	0,0917
pg/ml IL-10 (ELISA)	22,31 (14,55 - 26,76)	57,55 (25,6 - 127,9)	0,0653
% B CD24 <sup>high</sup> CD27 <sup>+</sup>	8,05 (6,83 - 12,37)	12,20 (10,50 - 21,10)	0,0727
% B CD24 <sup>CD27</sup>	10,72 (7,51 - 16,30)	12,1 (8,44 - 17,50)	0,5879