UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Análisis fenotípico y funcional de linfocitos B de memoria y productores de anticuerpos específicos para *Trypanosoma cruzi* en la enfermedad de Chagas.

Tesis presentada para optar por el título de doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Gonzalo Leandro Cesar

Director: Dra. Susana A. Laucella
Consejero de estudios: Dra. Mirta Schattner
Lugar de trabajo: Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chaben
Hospital Interzonal General de Agudos Nº2 Eva Perón (Ex Castex)

Resumen

Título: Análisis fenotípico y funcional de células secretoras de anticuerpos y linfocitos B de memoria específicos para *Trypanosoma cruzi* en la enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) es la enfermedad parasitaria de mayor impacto en América Latina y un problema de salud creciente en países no endémicos debido a los flujos migratorios. Una gran limitación para evaluar la eficacia el tratamiento con benznidazol es la falta de pruebas diagnósticas que muestren a corto plazo los efectos del tratamiento. Los ensayos de serología convencional requieren un largo tiempo de seguimiento para observar la negativización completa, algo que ocurre en alrededor de un 30% de los pacientes tratados. Se desconoce si los anticuerpos que se detectan en la circulación de los pacientes con infección crónica provienen de células B vírgenes o linfocitos B de memoria que se diferencian continuamente a plasmablastos ante la persistencia del parásito o de linfocitos de larga vida que pueden persistir aún en ausencia del antígeno que le dieron origen. La presencia de linfocitos B de larga vida alojados en médula ósea o ganglios linfáticos podría enmascarar la desaparición de plasmablastos dependientes de la presencia de antígeno luego del tratamiento específico.

En este trabajo nos propusimos medir los niveles de linfocitos B secretores de anticuerpos y células B de memoria específicas para *T. cruzi* y totales en la circulación de pacientes adultos y pediátricos con enfermedad de Chagas crónica mediante el ensayo de ELISPOT previamente a recibir el tratamiento con benznidazol y a distintos tiempos postratamiento. Los cambios en las poblaciones de linfocitos B se correlacionaron con la evolución serológica de los pacientes medida por técnicas de serología convencional y no convencionales. Mediante un método de tinción por citometría de flujo que utiliza proteínas recombinantes de *T. cruzi* marcadas con fluorocromos como "cebos", analizamos el fenotipo de las células B específicas para *T. cruzi*. Finalmente, se evaluó la capacidad funcional de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B totales en la circulación de pacientes con distinto grado de disfunción cardíaca.

La mayoría de los individuos infectados con *T. cruzi* presentaron CSAs (plasmablastos) específicos para un lisado de *T. cruzi* en su circulación, y estas células desaparecieron luego del tratamiento con benznidazol sólo en aquellos pacientes que mostraron una disminución de los niveles de anticuerpos indicativos de eficacia (ya sea negativización completa de la serología o caída significativa de títulos), pero no en aquellos pacientes con títulos serológicos inalterados. Con respecto a los niveles de células B de memoria, estos fueron bajos, ya sea antes, así como

después del tratamiento. La disminución en los niveles de células secretoras de anticuerpos específicos para *T. cruzi* se correlación con la disminución en los niveles de anticuerpos medidos por el ensayo de multiplex y precedió la disminución de anticuerpos medidos por serología convencional. Las células B específicas para las proteínas recombinantes de *T. cruzi* se componen principalmente de células de memoria atípicas, células vírgenes en reposo y plasmablastos.

Del análisis del fenotipo B total observamos una distribución anormal de células B en individuos con enfermedad crónica, particularmente un aumento en la frecuencia de células B de memoria atípicas y plasmablastos tanto en adultos como en niños infectados con *T. cruzi*. El tratamiento con benznidazol logró restaurar un fenotipo similar al observado en personas no infectadas.

En el análisis funcional observamos que existe una disfunción en la producción de citocinas inflamatorias en los pacientes con compromiso cardíaco avanzado Particularmente pudimos ver que, luego de la estimulación policlonal, las células B de memoria atípica presentan poca capacidad para secretar IL-6 y TNF-α, mientras que observamos que la mayor producción de citocinas se da por parte de células B vírgenes activadas y células B $CD27^{+}CD21^{+}HLADR^{+}$ que probablemente corresponda a un fenotipo de memoria previo a la activación y perdida de la molécula CD21.

Estos hallazgos en conjunto muestran la viabilidad de detectar células B específicas para *T. cruzi* en la fase crónica de la enfermedad de Chagas. La lenta caída en los niveles de anticuerpos específicos para el parásito luego del tratamiento puede deberse a la presencia de linfocitos B de larga vida confirmando la hipótesis de esta tesis. La infección crónica también induciría alteraciones en la diferenciación y función de células B. El seguimiento de CSAs específicas para el parásito serviría como una herramienta útil para determinar la eficacia de tratamiento en protocolos de ensayos clínicos.

Palabras clave: **Plasmablastos, Células B, Células B de memoria, *T. cruzi*, Células secretoras de anticuerpos.**

Summary

Title: Phenotypic and functional analysis of antibody secreting cells and memory B cells specific to *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease.

Chagas disease (American trypanosomiasis) is the parasitic disease with the greatest health impact in Latin America and a growing health problem in non-endemic countries due to migratory flows. A major limitation for the evaluation of the efficacy of treatment with benznidazole in the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection is the lack of reliable tools for assessing treatment outcome in the short term. Complete conversion to negative serology using standard tests can take more than 10 years and is achieved in less than 40% of treated subjects. It is unknown whether the antibodies detected in the circulation of chronically infected subjects derive from naïve B cells or memory B lymphocytes that continually differentiate into plasmablasts in the phase of parasite persistence, or from long-lived plasma cells that persist for a long time in the absence of antigen. Because plasmablasts are rarely present in the circulation in the absence of antigen or of viable replicating pathogens, measurement of *T. cruzi*-specific plasmablasts after anti-parasite treatment could provide a rapid assessment of treatment efficacy relative to the measurement of *T. cruzi*-specific antibodies, whose decay can be masked by antigen-independent persistence of antibodies derived from long-lived plasma cells.

In this work we propose to measure the levels of antibody-secreting B lymphocytes and memory B cells in the circulation of adult and pediatric patients with chronic Chagas disease using the ELISPOT assay prior to receiving treatment with benznidazole and at different post-treatment times. The changes in the B lymphocyte populations were correlated with the serological outcome of treatment measured by conventional and unconventional serologic techniques. Using a flow cytometry staining method and fluorochrome-labeled recombinant *T. cruzi* proteins as "baits," we analyzed the phenotype of *T. cruzi*-specific B cells. Finally, the functional capacity of the different subpopulations of B lymphocytes in the circulation of patients with different degrees of cardiac dysfunction was evaluated.

Most individuals infected with *T. cruzi* had antibody-secreting cells (i.e., plasmablasts) specific for a *T. cruzi* lysate in their circulation, and these cells disappeared after benznidazole treatment only in those patients who showed decreased levels of parasite-specific antibodies (either complete negativization of serology or a significant decay of titers), but not in those patients with unaltered antibody levels. *T. cruzi*-specific memory B cells generally exhibited lower prevalence prior to treatment in adults and children and these levels did not improve after

therapy regardless of treatment outcome. In subjects with declining serology (i.e., regarded as successful treatment outcome), the decay in antibody secreting B cells correlated with the decrease in *T. cruzi*-specific antibodies using the multiplex technique and preceded the decline in antibody levels by conventional serologic tests. B cells specific for *T. cruzi* recombinant proteins are mainly comprised of atypical memory cells, resting naïve cells, and plasmablasts.

An abnormal distribution of total B cells, particularly an increase in the frequency of atypical memory B cells and plasmablasts in both adults and children infected with *T. cruzi* was observed prior to treatment and the phenotype returned to a non-infection profile after successful treatment. After polyclonal stimulation, atypical memory B cells had a low capacity to secrete IL-6 and TNF-α, while activated naïve B cells and $CD27^{+}CD21^{+}HLADR^{+}$ B cells had the highest capacity to produce inflammatory cytokines.

Taken together, these findings show the feasibility of detecting *T. cruzi*-specific B cells in the chronic phase of Chagas disease. The slow decrease in the levels of parasite-specific antibodies after treatment may be due to the presence of long-lived B plasma cells confirming the hypothesis of this thesis. Chronic *T. cruzi* infection also induced alterations in B-cell differentiation and function. Monitoring of parasite specific antibody-secreting cells would serve as a useful tool to determine treatment efficacy in clinical trial protocols.

Keywords: **Plasmablast, B cells, Memory B cells, *T. cruzi*, Antibody secreting cells.**

Agradecimientos

A la Dra. Susana Laucella por los años de formación, el acompañamiento en cada paso, y su dedicación incondicional. A Mariela Alvarez, por su excelente trabajo con los pacientes. A ambas por permitirme formar parte de sus vidas, y hacer ciencia sin olvidarnos que somos humanos.

A mis compañeras de trabajo Meli, Josefina y Ailen. A Cecilia y Laura. Por compartir el tiempo de trabajo y de ocio que facilitaron los momentos difíciles y me dejaron bellos recuerdos.

Al Dr. Rodolfo Viotti por su enorme aporte científico al estudio de la enfermedad de Chagas y por su trabajo desinteresado por mejorar la calidad de vida de los pacientes.

A los Dres. Bruno Lococo y Graciela Bertocchi, cardiólogos del Hospital Eva Perón por su colaboración en este trabajo.

A todos los miembros del Instituto Nacional de Parasitología y del Hospital Eva Perón que formaron parte de este proceso, principalmente a la Dra. Mónica Esteva y Rodolfo Dalmau.

Al Dr. Rick Tarleton por la posibilidad de realizar una estadía en su laboratorio que fue asombrosa. A los Dres. Ángel Padilla, Fernando Sanchez-Valdez y Juan Bustamante, por ayudarme en todo lo que pudieron y por su calidez infinita.

A Pachi, Ariel y Sole del INIGEM por compartirme todo lo que saben, por su excelente predisposición y compromiso con su trabajo.

A mi familia, mi papá y mi mamá, por enseñarme a que nunca hay que bajar los brazos, por enseñarme el sacrificio. A mi tío Abel. A mis hermanos, Daniela, Mariela y Gabriel, y a mis sobrinos Isabella, Gianluca y Valentino.

A mi amigo Nicolas, compañero de anécdotas, incontables vivencias y por sacar lo mejor de mí. A mi amigo de la infancia Juan, por estar siempre, aunque los años pasen y nos encontremos lejos.

A mis mascotas por su amor incondicional.

A Daniel y Norma por la confianza que pusieron en mí.

A mi pareja Luján por acompañarme en todo, por el aguante y porque sin ella creo que ya me habría perdido hace tiempo.

A las autoridades del Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén y del ANLIS-MALBRÁN, del H.I.G.A Eva Perón, del CONICET, de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, USA) y del Centro de Enfermedades Tropicales y Emergentes (CTEGD, UGA, USA), por los subsidios, las becas y/o por otorgar el espacio físico para realizar este trabajo.

A la Universidad pública por la formación de excelencia, y a todos los docentes que formaron parte de ello.

A todos los pacientes que donaron su sangre y confiaron en nosotros para participar de este proyecto.

Índice

1. Introducción 11

1.1 La enfermedad 11

1.2 Características y ciclo de vida del parásito *Trypanosoma cruzi* 11

1.3 Epidemiología 13

1.4 Mecanismos de transmisión de la infección 13

1.5 Formas clínicas de la enfermedad de Chagas 14

1.6 Diagnóstico 15

1.7 Patogénesis de la enfermedad de Chagas 16

1.8 Tratamiento etiológico para la infección por *T. cruzi* 16

1.9 Impacto del tratamiento durante la fase crónica en adultos 18

1.10 Respuesta inmunológica en la infección con *T. cruzi* y agotamiento de la respuesta celular T 19

1.11 Generación de centros germinales ASC y de memoria dependiente de linfocitos T colaboradores 21

1.12 Respuesta humoral hacia antígenos independientes de linfocitos T colaboradores $CD4^+$ 22

1.13 Subtipos de células B 22

1.14 Agotamiento inmunológico en células B 25

1.15 Respuesta celular B en la infección con *T. cruzi* 26

1.16 Hipótesis 29

1.17 Objetivo general 30

1.18 Objetivos específicos 30

2. Materiales y Métodos. 33

2.1 Diseño experimental 33

2.2 Selección de la población de estudio 35

2.3 Recolección de CMPs y suero. 36

2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction, PCR) 37

2.5 Lisado de epimastigotes de *T. cruzi* 37

2.6 Proteínas recombinantes de *T. cruzi* 38

2.7 Determinación de la concentración proteica. 39

2.8 Evaluación de anticuerpos específicos para *T. cruzi* empleando el ensayo de multiplex ... 39

2.9 Ensayo ELISPOT o inmunoabsorción unida a enzimas (*enzime linked immunosorbent spot*) para células B. 40

2.11 Cuantificación de linfocitos B productores de citocinas y su fenotipo luego de la estimulación policlonal. 44

2.12 Fenotipo células B totales. 45

2.13 Análisis estadístico 46

3. Resultados 48

3.1 Puesta a punto de la técnica ELISPOT para la detección de CSAs y células B de memoria. 48

3.2 Preponderancia de CSAs en la circulación de pacientes con enfermedad de Chagas 50

3.3 Fenotipo de las células B específicas para *T. cr*uzi 52

3.4 Análisis compartimento total de células B después del tratamiento antiparasitario. 55

3.5 Análisis de la producción de citocinas y polifuncionalidad de las diferentes subpoblaciones de células B en la circulación de individuos con enfermedad de Chagas crónica. 58

3.6 Desaparición de las CSAs específicas para *T. cruzi* de la circulación de pacientes con reducción en los títulos de anticuerpos específicos después del tratamiento con benznidazol. 62

3.7 Correlación entre los cambios en los niveles de CSAs y los títulos serológicos 65

3.8 Evaluación del fenotipo total de células B despues del tratamiento en adutos y niños 71

4. Discusión 76

5. Conclusiones 86

6. Bibliografía 90

7. Abreviaturas 116

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La enfermedad

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Entre 6 y 8 millones de personas se encuentran infectadas con este parásito, siendo la causa infecciosa más frecuente de miocardiopatía dilatada a nivel mundial (Feldman y McNamara 2000; OMS 2021). La enfermedad fue identificada en Brasil por Carlos Chagas en 1909, quien describió al mismo tiempo el agente causal, el vector que lo transmite y la enfermedad (Chagas 1909). Más adelante, el Dr. Salvador Mazza registró miles de casos del mismo tipo en la Argentina, describió la etapa crónica de la enfermedad y distintos aspectos de la transmisión (Mazza 1936, 1943, 1949).

1.2 Características y ciclo de vida del parásito *Trypanosoma cruzi*

El parásito *Trypanosoma cruzi* pertenece al grupo de los kinetoplástidos y presenta tres formas en su ciclo de vida: el tripomastigote, el amastigoste y el epimastigote. A lo largo del ciclo, alterna entre un hospedador mamífero y el insecto vector (Figura 1). Los vectores se infectan cuando se alimentan de personas u otros animales con parásitos circulantes. Los tripomastigotes ingeridos se transforman en epimastigotes en el intestino medio del insecto, allí se multiplican y diferencian a la forma de tripomastigote metacíclico infectivo en el intestino posterior. El insecto vector hematófago infectado, al alimentarse defeca cerca del lugar de la picadura, donde libera los tripomastigotes que ingresan a través de la herida o de las mucosas, si entran en contacto con estas (Figura 1). Las especies de triatominos más comunes que son vectores de esta enfermedad pertenecen a los géneros de *Triatoma*, *Rhodnius*, y *Panstrongylus.* Cerca de la zona de ingreso, los tripomastigotes infectan las células presentes en el hospedador y se transforman en amastigotes, la forma intracelular. Estos se dividen por fisión binaria y se diferencian a tripomastigotes que se liberan a la circulación e infectan distinta variedad de células, luego se transforman nuevamente en amastigotes intracelulares en el nuevo sitio de infección (Figura 1).

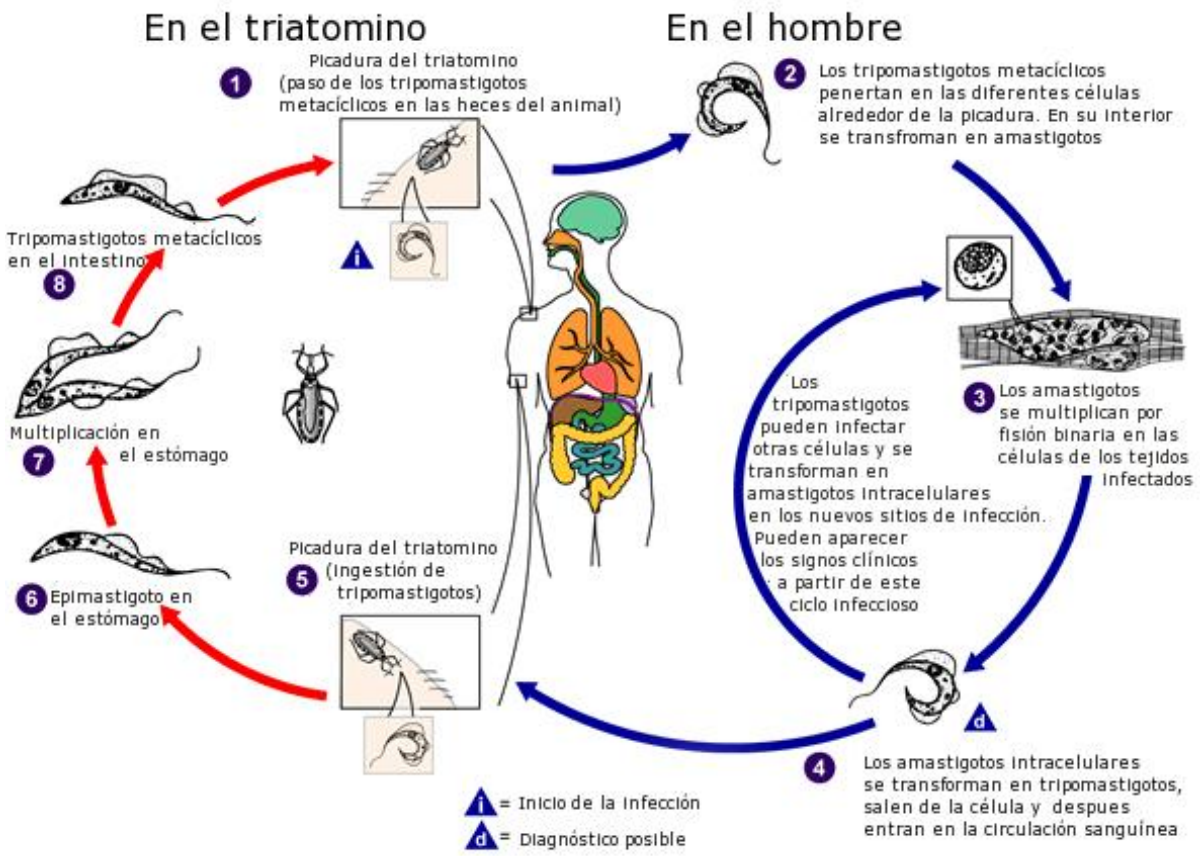

Figura 1. Ciclo de vida del parásito *Trypanosoma cruzi*. Fuente: Centros para el Control y la Prevención de enfermedades (CDC) de Estados Unidos. https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html

El parásito *T. cruzi* se ha clasificado en siete unidades de tipificación discretas (DTU), TcI-TcVI y Tcbat (Tibayrenc 1998; Zingales 2018). Las DTU fueron definidas como grupos que están genéticamente más relacionados entre sí que con cualquier otro grupo, y que son identificables por marcadores genéticos, moleculares e inmunológicos en común. Algunas de estas DTU a su vez presentan subclasificaciones. Cada DTU está asociada mayoritariamente a una zona, a un vector, a un tipo de patogenia y a un ciclo de trasmisión determinado (Zingales 2012; Zingales 2018) (Figura 1).

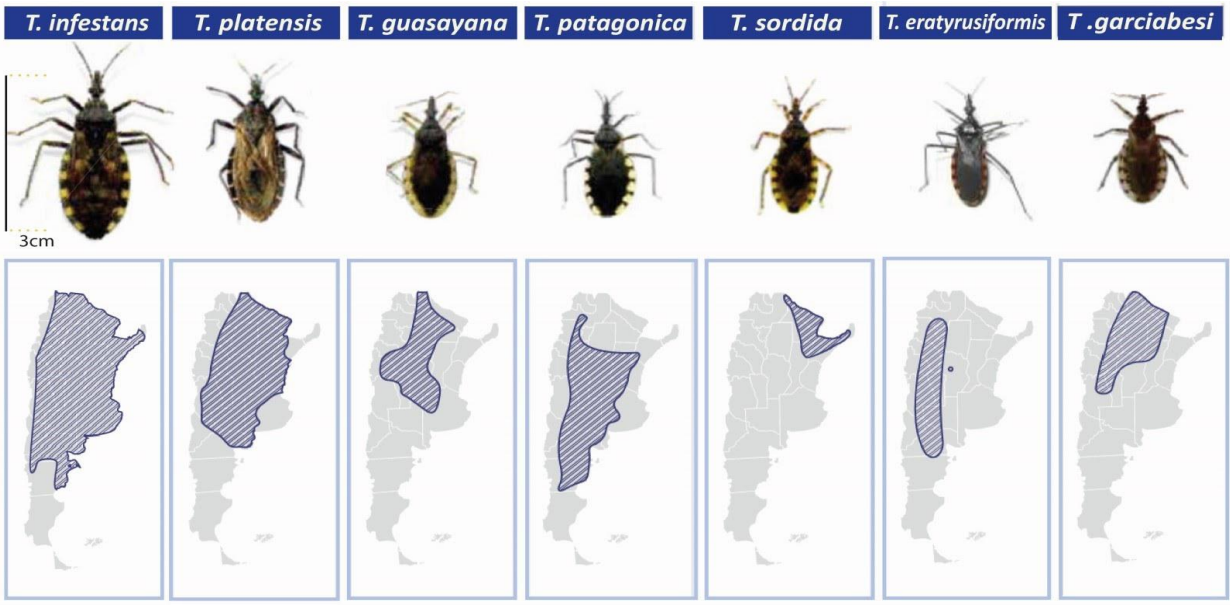

Figura 2. Principales especies de triatominos con distribución en la República Argentina, (Ceccarelli et al., 2020).

1.3 Epidemiología

La infección por *T. cruzi* puede ocurrir por la picadura del vector infectado, por trasmisión congénita (alrededor de un 5%), transfusiones con material contaminado, trasplante de un órgano infectado, accidentes de laboratorio o comida o bebida infectada (OMS 2021). La enfermedad es endémica en el continente americano y afecta a individuos en Europa y Asia debido a las corrientes migratorias (OMS 2021). La vía de trasmisión vectorial se da principalmente en zonas rurales donde es frecuente encontrar casas de adobe con techos de paja, sitios donde la vinchuca suele alojarse. A lo largo del tiempo se han realizado campañas para el control vectorial —el modo más efectivo de prevenir la trasmisión vectorial de la enfermedad—, pero que no han sido constantes en muchas zonas y por lo tanto insuficientes para lograr un freno en la trasmisión de manera permanente (Gürtler 2009).

1.4 Mecanismos de transmisión de la infección

Transmisión vectorial: involucra el contacto directo con el vector, triatominos de varios géneros de comportamiento, hábitat y distribución geográfica diferentes. Podríamos llamarla transmisión cutánea para diferenciarla de la oral, en la cual el vector también está involucrado. Ocurre por la contaminación de pequeñas fisuras en la piel y el propio punto de picadura o a través de conjuntivas, por las heces de un triatomino conteniendo tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*. En el 30% de los casos humanos hay evidencia de la penetración del parásito por la inflamación en la puerta de entrada (signo de Romaña y el chagoma de inoculación).

Transmisión transfusional: ocurre en la persona que recibe sangre con tripomastigotes circulantes de *T. cruzi* de un donante infectado. El riesgo de adquirir la infección por *T. cruzi* es variable, siendo proporcional a la prevalencia de la infección en el país endémico donde ocurre la transfusión e inversamente proporcional al cribado realizado en los bancos de sangre (Schmunis 1998).

Transmisión transplacentaria: la madre infectada en fase aguda o crónica puede transmitir el parásito a su hijo por tripomastigotes circulantes o por la ruptura de nidos de amastigotes en el útero, los cuales pueden pasar al feto (Billot 2005).

Transmisión por trasplante de órganos: los nidos de amastigotes contenidos en cualquier tejido a trasplantar pueden continuar su evolución a tripomastigotes circulantes en pacientes receptores inmunosuprimidos para tolerar el nuevo el tejido (Martín-Dávila 2008).

Transmisión oral: los tripomastigotes metacíclicos del parásito son capaces de sobrevivir en jugos de frutas o en leche por varias horas e infectar a un hospedero vertebrado a través de la ingestión oral. Los tripomastigotes metacíclicos presentes en las glándulas anales de *Didelphis* infectados pueden contaminar alimentos en incursiones que estos animales realizan en las viviendas (Alarcon de Noya 2010*)*.

Transmisión accidental: durante la manipulación en el laboratorio de cultivos con tripomastigotes, triatominos y material biológico de humanos o animales infectados, es posible que ocurra la contaminación del personal que los maneja (Brener 1987).

1.5 Formas clínicas de la enfermedad de Chagas

La enfermedad presenta distintas etapas. La primera etapa, denominada fase aguda, es generalmente asintomática o con algunos síntomas inespecíficos. En algunos casos puede presentarse el signo de Romaña o chagoma, que consiste en una inflamación del ojo provocada por el ingreso de parásitos a través de las mucosas. Esta etapa se caracteriza por una elevada presencia de parásitos en sangre, siendo no identificables por búsqueda al microscopio (Prata 2001). Una vez finalizada la etapa aguda, cuando los parásitos ya se encuentran mayormente alojados en las células que han infectado, y por lo tanto en muy bajo número en la circulación, se establece la etapa crónica. El 70-80% de los pacientes permanece en una fase crónica indeterminada, es decir que el estado clínico del individuo no presenta alteraciones clínicas, ya sean cardiológicas o digestivas demostrables en el momento del diagnóstico, debido a que se establece una fase de equilibrio entre el parásito, la respuesta inmune especifica y la respuesta inflamatoria inespecífica, permaneciendo asintomático por largos períodos de tiempo o aun toda la vida. En los casos en que la enfermedad progresa, el órgano afectado podría estar relacionado con el tropismo del parásito. En la Argentina se han encontrado las DTU I, II, V y VI asociadas a

explantes, en circulación de pacientes trasplantados y en individuos infectados en zona endémica (Burgos 2010; Macchiaverna 2018). Aproximadamente el 30% de los pacientes infectados desarrollarían la patología cardíaca (TDR/WHO 2012).

En 1985, el Dr. Kuschnir clasificó las distintas formas clínicas en que se diferencia la etapa crónica en los siguientes grupos (Kuschnir 1985): **G0**, que comprende a pacientes con electrocardiograma (ECG) normal y radiografía de tórax (Rx) normal; **G1**, pacientes con alteraciones electrocardiográficas asociadas con la enfermedad de Chagas (por ejemplo, bloqueo completo de rama derecha, hemibloqueo anterior izquierdo o posterior, extrasístoles ventriculares severas, bloqueo aurículo-ventricular de 2.° y 3.er grado y depresión de nódulo sinusal, colocación de marcapaso) y Rx normal; **G2**, pacientes con alteraciones electrocardiográficas asociadas a la enfermedad de Chagas y Rx con evidencia de cardiomegalia o dilatación de ventrículo izquierdo con función sistólica global disminuida, sin insuficiencia cardíaca; y **G3**, pacientes con alteraciones electrocardiográficas, cardiomegalia y signos clínicos y radiológicos de insuficiencia cardíaca con evidencias de lesión miocárdica. Posteriormente, el Dr. Viotti presentó una clasificación modificada respecto de la de Kuschnir donde se reemplaza la Rx por el ecocardiograma (Viotti 2011).

1.6 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se realiza mediante diferentes técnicas de acuerdo a la etapa que se esté analizando. Debido al elevado número de parásitos que se encuentra en la circulación en la etapa aguda, el diagnóstico se realiza por medio de métodos de concentración de una muestra de sangre y visualización directa de los parásitos al microscopio. Los métodos que se utilizan son la gota fresca, el micrométodo con capilares, micrométodo con microtubo y Strout (Ministerio de Salud de Argentina 2018). Durante la fase crónica se utilizan ensayos serológicos tales como inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*), la hemaglutinación indirecta (HAI) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI). Estos ensayos permiten cuantificar la presencia de anticuerpos específicos contra *T. cruzi*. Cuando dos de estas pruebas resultan positivas se considera que el individuo está infectado (TDR/WHO 2012; Ministerio de Salud de Argentina 2018).

La técnica de cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa para analizar la presencia de ADN parasitario en individuos presuntamente infectados es muy útil en el diagnóstico de casos agudos (por trasmisión oral o trasplante) y de trasmisión congénita luego de los 30 días del nacimiento, aunque no esté incluida aún como análisis de rutina

(Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén. Informe Técnico: Implementación de PCR en Tiempo Real en el Diagnóstico de Infección Vertical por *Trypanosoma cruzi*). En el caso de pacientes adultos con infección crónica resulta difícil la detección de ADN del parásito, ya que el número en circulación es muy bajo. En estos casos, esta técnica se utiliza como evidencia de falla terapéutica (Britto 2009; Schijman 2011).

1.7 Patogénesis de la enfermedad de Chagas

Se desconocen aún los procesos que gobiernan la fisiopatología de la enfermedad de Chagas. Hasta hace algunos años se sugería que la enfermedad de Chagas tenía una etiología autoinmune (Borda 1984; Masuda 1998; Labovsky 2007), sin embargo actualmente hay suficiente evidencia que indica que la persistencia del parásito es requerida para el desarrollo de la enfermedad. El empleo de técnicas de elevada sensibilidad para la detección del parásito, como PCR y ensayos de inmunohistoquímica para detectar antígenos parasitarios, ha permitido demostrar la persistencia *del T. cruzi,* o fragmentos de este en el miocardio, siendo así el estímulo para la respuesta inflamatoria crónica (Higuchi 1993; Reis 1993; Jones 1993). Sin embargo, cabe destacar que se ha descrito la existencia de reactividad cruzada entre antígenos del parásito y del huésped (López Bergami 2001; Gironés 2005; Smulski 2006), un mecanismo que podría ser responsable de fenómenos de hipersensibilidad hacia componentes propios del huésped.

También se sostiene que las alteraciones de la microcirculación podrían ser responsables de la inducción del daño cardíaco (Koberle 1974; Tanowitz 1992, 2005). Otro factor igualmente importante es el grado de efectividad de la respuesta inmune del huésped para controlar la replicación del parásito (Tarleton 1994; Tarleton, Zhang y Downs 1997). Estos dos factores están relacionados mutuamente. Uno de los mecanismos por el cual la persistencia del parásito podría afectar la respuesta inmune específica requerida para controlar la infección es a través de un proceso de agotamiento inmunológico, que podría ser el causante de un daño tisular acumulativo debido a la disfuncionalidad que poseen los linfocitos T agotados (Laucella 2004; Albareda 2006; Gutierrez 2009; Egui 2020). Otros autores han planteado que la patología cardíaca se originaría como consecuencia de un desbalance de la respuesta inmune, que sería incapaz de controlar el daño generado por una respuesta inmune sostenida (Dutra 2014; Longui 2014).

1.8 Tratamiento etiológico para la infección por *T. cruzi*

Para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas se utilizan el benznidazol (Abarax, Elea), y el nifurtimox (Lampit, Bayer), indicados según las normativas del Ministerio de Salud de la Nación. El tratamiento es recomendado durante la etapa aguda, en los casos de trasmisión congénita —en los que se ha demostrado una alta efectividad al realizar el tratamiento durante el

primer año de vida (Russomando 1998; Altcheh 2003)—, en niños y jóvenes hasta de 19 años y para mujeres en edad fértil, donde se ha probado que previene la trasmisión al bebé (Sosa-Estani 2009 A; Moscatelli 2015; Murcia 2017; Álvarez 2017; Ministerio de Salud de Argentina 2018).

Benznidazol

El benznidazol es un nitroimidazol (Boainain y Rassi 1979) y su mecanismo de acción se basa en que los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo del parásito son defectuosos. La actividad catalasa y glutatión peroxidasa no se han encontrado en *T. cruzi* (Krauth-Siegel 2003; Wilkinson y Kelly 2003: Turrens 2004). El parásito es capaz de reducir al glutatión a través de tripanotiona reductasa característica de los tripanosomátidos e indispensable para la reducción del glutatión (Turrens 2004). Los mamíferos, en cambio, cuentan con las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa y, además, con mecanismos antioxidantes no enzimáticos. Por todo esto, las drogas utilizadas para la infección con *T. cruzi* generan especies reactivas del oxígeno que atacan al parásito mientras que las células de mamífero pueden controlar de mejor manera la presencia de estas especies.

El modo de acción del benznidazol es a través de la formación de radicales libres y/o metabolitos electrófilos. Las nitroreductasas se encargan de reducir el grupo nitro del benznidazol a un grupo amino, generando la formación de diversos radicales libres intermedios y metabolitos electrófilos (Moreno 1982). En el parásito, la enzima nitroreductasa de tipo I, dependiente de NADH y ausente en humanos, metaboliza al benznidazol. La reducción del benznidazol lleva a la formación de derivados que terminan con el glioxal (agente citotóxico y mutagénico). Luego, a partir de transformaciones no enzimáticas, el intermediario de hidroxilamina cambia a 4,5-dihidro-dihidroximidazol. En solución acuosa, estas moléculas se encuentran en equilibrio con el glioxal y un producto de guanidina sustituida. El glioxal es un dialdehído reactivo muy tóxico que es capaz de modificar químicamente proteínas, lípidos y ácidos nucleico (Mason y Holtzman 1975). Estas evidencias llevaron a plantear que el glioxal es el responsable de la toxicidad del benznidazol, pero se ha demostrado que la producción de este compuesto es demasiado lenta como para que sea el único responsable. En mamíferos, la nitroreductasa de tipo II reduce el grupo nitro a amino, con la formación del intermediario anión radical nitro que es sensible al O_2. En presencia de O_2, el anión radical nitro se oxida nuevamente a benznidazol llevando a la formación simultánea de ROS (O_2- y H_2O_2) y por lo tanto generando daño celular oxidativo. En ausencia de O_2, el anión radical nitro cambia a nitroso, éste es muy reactivo y puede conducir a daño celular directa o indirectamente, debido a la formación de derivados hidroxilamina.

A través de estudios observacionales, se ha demostrado que un esquema de tratamiento de 30 días en pacientes con infección crónica presenta una eficacia comparable al que se observa con un tratamiento 60 días (Barclay 1979; Viotti 1994, 2006), reduciendo la posibilidad de aparición de efectos adversos graves tales como neuropatía y neutropenia. De la misma forma, un esquema de tratamiento intermitente en pacientes en etapa crónica de la infección ha reducido considerablemente la tasa de suspensión, ya que prácticamente no se observaron efectos adversos severos pero sí una reducción de los títulos de anticuerpos específicos para *T. cruzi* (Álvarez 2016; Álvarez 2020).

Nifurtimox

El nifurtimox es un nitrofurano que genera la liberación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, siendo estos compuestos tóxicos para el parásito, que es sensible a las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Docampo 1979). Para el tratamiento en pacientes adultos, la droga de preferencia es el benznidazol ya que se ha mostrado que el nifurtimox presenta una mayor toxicidad (Le Loup 2011; Rojo 2014). El tratamiento se lleva a cabo en 2 o 3 tomas diarias con una dosis de 8-12 mg/kg/día, de acuerdo a la edad del paciente, y durante 60 días (Ministerio de Salud de Argentina 2018).

1.9 Impacto del tratamiento durante la fase crónica en adultos

Una de las limitaciones más importantes del tratamiento específico para la enfermedad de Chagas crónica con benznidazol es la aparición de efectos adversos que puede llevar, en los casos severos, a la suspensión del tratamiento. La tasa de suspensión como consecuencia de las reacciones adversas varía entre un 12-31% de los pacientes adultos tratados (Viotti 2009; Pinazo 2010; Hasslocher-Moreno 2012), observándose alrededor de los 10 días de tratamiento. Por el contrario, la tolerancia al tratamiento parasiticida es mayor en niños, cuya tasa de suspensión es de aproximadamente el 6% (Altcheh 2011).

Distintos trabajos han demostrado la eficacia del benznidazol a la hora de disminuir y hasta negativizar la serología en los pacientes adultos con infección crónica (Viotti 1994; Fabbro 2007; Viotti 2011). Pese a esto, menos del 1% de los pacientes adultos con Chagas crónico en la Argentina son tratados (Ribeiro 2009). Se ha demostrado también que, en las formas clínicas avanzadas de la enfermedad donde la cardiopatía está instalada, el tratamiento parasiticida no revierte el daño ocasionado por décadas de infección (Morillo 2015). Todos estos resultados evidencian la importancia de llevar a cabo el tratamiento en etapas tempranas de la infección, cuando el daño cardíaco aún no se ha desarrollado. Una gran limitación para evaluar la eficacia

el tratamiento es la falta de pruebas diagnósticas que muestren los efectos del tratamiento a corto plazo.

Los ensayos de serología convencional requieren un largo tiempo de seguimiento para observar la negativización de la serología convencional, algo que ocurre en alrededor de un 30% (Viotti 1994; Fabbro 2007; Sosa-Estani 2009 B; Viotti 2011). Por ese motivo, actualmente se considera también como medida de eficacia la caída de los títulos serológicos, ya sea por serología convencional o a través de ensayos no convencionales como el ensayo de multiplex utilizando proteínas recombinantes (Cooley 2008; Laucella 2009) o ELISA con antígenos recombinantes (Niborski 2016; Alonso-Padilla 2021). Se desconoce el origen de los anticuerpos que persisten luego del tratamiento específico.

Las causas que podrían condicionar la eficacia del tratamiento son diversas, incluyendo la cepa del parásito, la carga parasitaria y la competencia inmunológica del huésped. En el modelo experimental murino se ha demostrado que el tratamiento con benznidazol en ratones inmunocomprometidos infectados con *T. cruzi* es menos eficaz (Toledo 1991; Romanha 2002), mientras que el tratamiento con benznidazol suplementado con un tratamiento adyuvante con IL-12 recombinante aumenta la eficacia de la droga parasiticida (Michailowsky 1998). En la infección humana por *T. cruzi* se ha sugerido que el IFN-γ tendría un rol central en la eficacia del tratamiento con benznidazol (Bahia-Oliveira 2000; Sathler-Avelar 2006; Álvarez 2016; Albareda 2018; Egui 2020). También se ha demostrado que pacientes adultos con infección crónica que recibieron un tratamiento incompleto con benznidazol debido a la aparición de efectos adversos lograron alcanzar la negativización completa de la serología convencional (Álvarez 2012). El grado de agotamiento de linfocitos T que presentaban estos pacientes con tratamiento incompleto al inicio del tratamiento fue un factor determinante del éxito terapéutico (Castro Eiro 2021).

1.10 Respuesta inmunológica en la infección con *T. cruzi* y agotamiento de la respuesta celular T

El parásito *T. cruzi* presenta distintas formas de su ciclo de vida en el mamífero: el tripomastigote circulante y el amastigote intracelular, por lo que el control de la infección se da por distintos mecanismos, participando los macrófagos, células NK y linfocitos T y B (Acevedo 2018). La forma circulante es susceptible a la destrucción por anticuerpos y a la fagocitosis por células fagocíticas activadas. Los anticuerpos líticos tienen un rol fundamental en el control de la infección aguda (Krautz 2000). Se ha demostrado además que la ausencia de linfocitos B en

ratones resulta en una infección letal (Kumar y Tarleton 1998). Una vez dentro de la célula blanco, el parásito se replica como amastigote, y entonces resulta fundamental el rol de las células T $CD8^+$ y $CD4^+$. Varios trabajos han demostrado que la eliminación de linfocitos T $CD8^+$ lleva a una proliferación incontrolable de los parásitos (Tarleton 1992, 1994; Tarleton 2015). Del mismo modo, luego de la depleción de linfocitos T $CD4^+$ se observa una disminución en la producción de IFN-γ (Rottenberg 1993). Pese a un eficiente control del parásito, el sistema inmune no es capaz de eliminarlo completamente, razón por la cual el mismo persiste, evidenciando su gran capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedador. Se ha demostrado que una vez que el parásito ingresa a través de la piel, no es reconocido hasta los cinco o seis días luego de la infección (Padilla 2009). En su forma intracelular, el parásito se divide y logra completar varias rondas de duplicación hasta que en el cuarto o quinto día se lisa la célula y los parásitos son liberados, coincidiendo este tiempo con el reconocimiento del parásito por parte del sistema inmune. Los linfocitos T $CD8^+$ específicos para *T. cruzi* se observan a partir del octavo o noveno día posinfección, siendo las proteínas transialidasas del parásito una de las más inmunogénicas, tanto en ratones como en humanos (Martin 2006; Álvarez 2008).

Distintos grupos de investigación han realizado un análisis exhaustivo de la respuesta celular T especifica hacia *T. cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, tanto en adultos (Abel 2001; Gomes 2003; Laucella 2004; Albareda 2009; Cuellar 2009; Egui 2015; Acevedo 2019; Guedes 2012; Longhi 2014) como en niños (Sathler-Avelar 2006; Albareda 2013). Uno de los hallazgos más importantes ha sido la observación de que la infección crónica por *T. cruzi* conduciría a la respuesta celular T específica para el parásito a un estado de agotamiento inmunológico, característico de las infecciones persistentes, tanto virales (Virgin 2009; Wherry 2015) como parasitarias (Zander 2013; López 2019). La capacidad funcional de los linfocitos T $CD4^+$ y T $CD8^+$ en pacientes adultos con enfermedad de Chagas crónica se asoció inversamente con el grado de compromiso cardíaco (Laucella 2004; Albareda 2006; Albareda 2009; Egui 2015; Perez Antón 2020). En cambio, a partir de los estudios realizados en niños infectados con *T. cruzi*, quienes presuntamente tendrían un tiempo más corto de infección, la respuesta celular T específica para *T. cruzi* presenta una mayor capacidad polifuncional y de mayor magnitud (Albareda 2013, 2018) comparada con la de pacientes adultos. Se ha demostrado también que las poblaciones de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ totales se encuentran enriquecidas en células con alto grado de diferenciación (Albareda 2006; Albareda 2009; Egui 2015) y con defectos de señalización del receptor de IL-7 (Albareda 2015; Natale 2018). Se han encontrado además otros indicios de agotamiento inmune de linfocitos T en pacientes con enfermedad de Chagas crónico, tales como una baja capacidad proliferativa y la inhibición de la expresión de CD28 y CD3ζ

(Giraldo 2013), mayor producción de óxido nítrico (Sanmarco 2016) y aumento de la expresión de receptores inhibitorios en las células T (Lasso 2015; Perez-Anton 2018).
Otros autores han observado que la producción de IL-10 se asocia a formas clínicas de menor compromiso cardíaco en niños (Samudio 1998; Sathler-Avelar 2006) y adultos (Gomes 2003; Guedes 2012; Gomes 2014) infectados con *T. cruzi*, y una mayor producción de IFN-γ en respuesta a *T. cruzi* en pacientes con miocardiopatia severa comparados con individuos sin signos de enfermedad cardíaca (Abel 2001; Gomes 2003; Guedes 2012; de Araújo 2012).

1.11 Generación de centros germinales, células secretoras de anticuerpos y células B de memoria dependiente de linfocitos T colaboradores

En una respuesta contra un patógeno, las células B en el ganglio linfático comienzan a proliferar y diferenciarse en células secretoras de anticuerpos (CSAs) después del encuentro con antígenos proteicos y en presencia de células T colaboradoras activadas por el mismo antígeno (Nutt 2015). Después de la activación del receptor B por el antígeno, los antígenos proteicos son internalizados y presentados en contexto de las moléculas de histocompatibilidad de tipo II. Las células B activadas migran a la interfaz entre las zonas T y B donde se expanden como consecuencia de las señales provenientes de las células T colaboradoras $CD4^+$. En el espacio extra folicular, las células B activadas pueden seguir tres posibles escenarios: diferenciarse en células plasmáticas o sus precursores los plasmablastos de corta vida, en células B de memoria independiente de la colaboración T CD4 o migrar a los folículos para formar los centros germinales. Los anticuerpos producidos por las células plasmáticas en el espacio extra folicular son de baja afinidad, pero luego de entrar a la circulación permiten limitar la extensión de la infección. Sin embargo, estas células plasmáticas presentan algún grado de cambio de isotipo, pero no migran a sitios distantes.

En el centro germinal, las células B en proliferación se expanden dentro de los folículos secundarios en la zona del manto (Kometani 2015). Allí ocurre la maduración por afinidad a través de la hipermutación somática seguida de una selección que se basa en el reconocimiento de antígenos y con la colaboración de células T colaboradoras foliculares. Un número determinado de estas células se diferenciará a plasmablastos, que son células productoras de anticuerpos o a células B de memoria (Figura 3). Los plasmablastos generados en los CG tienen capacidad de migrar a la médula ósea donde se convertirán en células plasmáticas de larga vida si reciben señales de sobrevida del microambiente tisular. Factores extrínsecos y programas de diferenciación intrínsecos de linfocitos participan en el establecimiento de células plasmáticas de larga vida en la médula ósea y también en órganos linfoides secundarios. Estas células también

se observan en tejidos inflamados, pero en este caso particular desaparecen una vez resuelta la infección.

1.12 Respuesta humoral hacia antígenos independientes de linfocitos T colaboradores $CD4^+$

En ausencia de la ayuda de las células T, los ligandos de receptores tipo *toll* (TLR) de componentes microbianos asociados a patógenos (PAMP, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*), los lipopolisacáridos (LPS) o los ligandos asociados al daño celular (DAMP, del inglés *damage-associated molecular pattern*) pueden actuar de manera sinérgica con la señalización del receptor celular B (BCR) y así promover la activación de las células B (Bortnick 2012). Otras señales accesorias incluyen el factor activador de células B perteneciente a la familia de TNF (BAFF, del inglés *B cell activating factor belonging to the TNF family*), el factor de proliferación April (del inglés *a proliferation inducing ligand*, CD40 ligando y las citocinas IL-4, IL-6, IL-10 y IL-21. Estas señales suelen ejecutarse bajo condiciones específicas por varios tipos de células del sistema innato, como por ejemplo células *natural killers*, neutrófilos, monocitos, células dendríticas, y también mastocitos. Este tipo de respuesta está mayoritariamente asociada a las células B de tipo B1 de zona marginal que conducen a una inmunidad humoral mediada por anticuerpos IgM o IgG de baja afinidad a corto plazo. Sin embargo, en algunos casos pueden generar respuestas de memoria (Bortnick 2012).

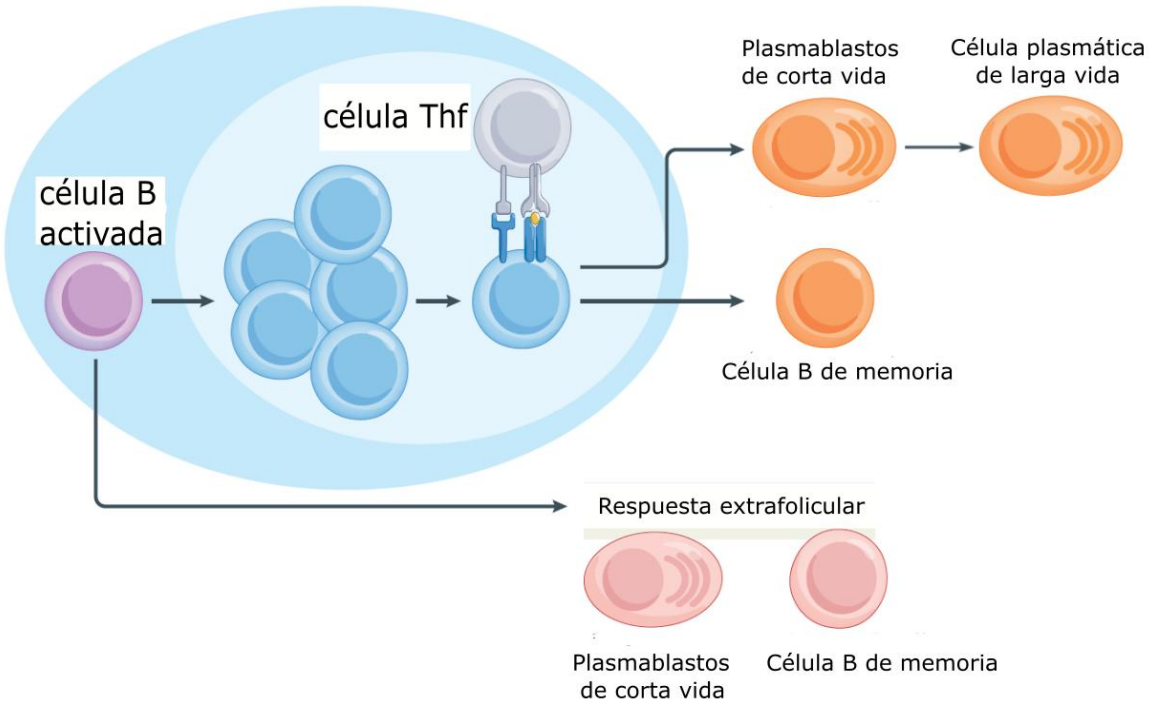

Figura 3: Generación de células plasmáticas y células B de memoria mediante la formación del centro germinal, o de manera independiente de este, mediante la respuesta extra folicular. Thf: células T colaboradoras foliculares (*Thf, del inglés folicular T helper cells*).

1.13 Subtipos de células B

De acuerdo a la expresión de distintos marcadores de activación y diferenciación, los linfocitos B se clasifican en distintos subgrupos, como se describe seguidamente (Sanz 2019).

Las células B naïve (vírgenes). Son las que abandonan la médula ósea para migrar a los órganos linfoides secundarios y que aún no tuvieron contacto con ningún antígeno. Pueden presentar $CD20^{+}$, $CD27^{-}$, $CD21^{\pm}$, $CD23^{\pm}$, IgM^{+}e $IgD^{\pm}$ $CD38^{+}$.

Las células B foliculares (FoB) o B-2. Se generan directamente en la médula ósea y llegan a los folículos de los órganos linfoides secundarios a través de la circulación. Se consideran células en reposo y constituyen la subpoblación más grande de células B. Su diferenciación está influenciada por una gran variedad de factores, incluidas las quimiocinas, la señalización del receptor B y algunos antígenos. Participan en las respuestas inmunitarias dependientes de T ya que pueden usar el receptor B para retener, procesar y presentar antígenos a las células T.

Las células B de la zona marginal (MZB). Este tipo de célula se ubica como centinela en las zonas marginales del bazo, región de interfaz entre la circulación y el tejido linfoide esplénico. Estas células B también habitan en la pared interna del seno subcapsular de los ganglios linfáticos, el epitelio de las criptas amigdalinas y la cúpula subepitelial de las placas de Peyer intestinales. En humanos presentan los marcadores IgM^{high}, IgD^{low}, $CD1c^{+}$, $CD21^{high}$, $CD23^{-}$ and $CD27^{+}$. MZB expresa altos niveles de receptores tipo *toll*, similar a lo observado en macrófagos, células dendríticas y granulocitos, que le permite desempeñar un papel de conexión entre las respuesta innata y adaptativa. Estas células tienen la capacidad de responder rápidamente a un estímulo específico mediante el uso de mecanismos independientes y dependientes de linfocitos T y luego transformarse en células plasmáticas que secretan IgM, IgG1, IgG2 (para ambas vías, TD y TI) , IgA1 (en la vía TD) e IgA2 (en la vía TI).

Células B-1. Estas son las primeras células B que se forman en el hígado fetal. Se subdividen en B1a y B1b, diferenciándose entre sí por la expresión de la glicoproteína de membrana CD5, ausente en B1b. Ambos tipos expresan marcadores CD9 y CD45RA y participan en respuestas inmunes independientes de linfocitos T colaboradores. Se encuentran en las cavidades peritoneal y pleural y son la fuente principal de Abs circulantes. Al igual que con el MZB, las células B-1 responden rápidamente a los estímulos específicos de Ag y se transforman en células plasmáticas.

CSAs. Este tipo de linfocitos B incluye células con capacidad proliferativa denominados plasmablastos que son las precursoras de otro grupo de células productoras de anticuerpos

maduras que se encuentran en reposo denominadas células plasmáticas. Estas células se diferencian a partir de células B activadas en presencia de IL-2 e IL-10. Presentan $CD27^{+}$ y $CD38^{hi}$. Pierden la capacidad de dividirse y sufren una serie de modificaciones, como por ejemplo, un aumento en su citoplasma debido al mayor crecimiento del retículo endoplásmico que se requiere para albergar la gran cantidad de ribosomas para la producción de Abs. También dejan de expresar CXCR5 y CXCR7 y aumentan CXCR4. Se conocen dos clases de células plasmáticas: Células de vida corta, que se localizan en la médula de los ganglios y, posteriormente, salen a circulación en busca de un sitio donde encontrar antígenos e iniciar, in situ, la producción de IgM específica. Las células de larga vida migran a un nicho en la médula ósea siguiendo la expresión de SDF-1 por parte de las células del estroma. Dentro de este nicho, inician la producción de anticuerpos de tipo IgG, que pueden usarse para montar una defensa prolongada o permanente contra el antígeno que originalmente activó las células B. La supervivencia prolongada de estas últimas células se debe al efecto de la IL-16. El desarrollo de células plasmáticas de vida corta o larga depende de la expresión del factor de transcripción Blimp-1 (proteína de maduración inducida por linfocitos B-1).

Células B de memoria. Hay varios subconjuntos de células B de memoria que se clasifican según su origen, la expresión diferencial de CD27 y la inmunoglobulina que se expresa. Se han descripto tres orígenes diferentes para estas células: i) el bazo, ii) el centro germinal y iii) la lámina propia del intestino fuera del centro germinal. En el bazo presentan marcadores $CD27^{+}IgG^{+}$. En el GC, son $CD27^{+}IgM^{+}IgD^{-}$ y cambian de Ig a $CD27^{+}IgG/IgA^{+}$. Por último, las generadas en el intestino expresan $CD27^{-}IgA^{+}$.
Podemos diferenciarlas en células B de memoria en reposo que presentan el fenotipo $CD20^{+}CD19^{+}CD27^{+}CD21^{+}$; células B activadas, $CD20^{+}CD19^{+}CD21^{-}CD27^{+}$ y células B de memoria atípica, $CD20^{+}CD19^{+}CD21^{-}CD27^{-}$.

Células B Reguladoras (Bregs). Las células B también liberan una amplia variedad de citocinas y, al igual que las células T, pueden clasificarse según el perfil de citocinas que producen. Por esto, los Bregs son un subconjunto funcional de las Células B y contribuyen al mantenimiento del fino equilibrio necesario para garantizar la tolerancia. Los Bregs restringen las respuestas inflamatorias excesivas que se producen durante las enfermedades autoinmunes o que pueden ser causadas por infecciones persistentes. La IL-10 es fundamental para la función de las Bregs ya que inhiben las citocinas proinflamatorias IFN-γ, IL-17, reducen la expresión de las moléculas MHC clase II y favorecen la diferenciación de los linfocitos T regulatorios. Se ha demostrado que la interacción CD40-CD154 es una vía de activación esencial para los Bregs. En

cuanto a los marcadores de superficie de Bregs, existe una gran controversia y el consenso es que no existe un único marcador, ni siquiera un conjunto de marcadores, que haga posible la identificación inequívoca de este tipo de células reguladoras. Entre los principales marcadores descriptos para la identificación de este tipo de células se encuentran: CD1dhigh, $CD5^{+}$, $CD19^{+}$, $CD24^{high}$, CD27variable, CD38 variable, CD138 variable, IgM^{high} e $IL\text{-}10^{+}$.

1.14 Agotamiento inmunológico en células B

El agotamiento de las células B se refiere esencialmente a la inhibición de las funciones normales o disfuncionalidad de las células B como consecuencia de infecciones por patógenos crónicos y/o latentes y enfermedades crónicas, como por ejemplo HIV (Moir 2008), hepatitis C (Kaplan 2017) o tuberculosis (Joosten 2016). Esta inhibición puede ser a largo plazo, como en el caso de las infecciones virales, tales como la hepatitis C, en la que se ha observado que incluso después de que el virus desaparece, la hipoproliferación y otros aspectos del agotamiento de las células B parecen estar programados genéticamente de manera duradera en las células B específicas para la hepatitis C (Kaplan 2017).

El agotamiento de las células B incluye una mayor expresión de múltiples receptores inhibitorios, expresiones alteradas de quimioquinas, ligandos y receptores de adhesión, y respuestas proliferativas deficientes a una variedad de estímulos antigénicos (Moir 2011). Los receptores inhibidores con motivos de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) se expresan durante la activación y diferenciación de las células B y se unen a distintos ligandos para activar vías de señalización intracelular específicas, que si bien son esenciales para la regulación de las células B, un aumento en su expresión, así como su persistencia derivan en una disminución de la función celular, anergia o agotamiento (Kardava 2011). También se han encontrado características de agotamiento de células B en la sangre de personas infectadas con *Plasmodium falciparum* (causante de malaria). El marcador FCRL4, que es característico de las células B de memoria agotadas, se expresa en niveles significativamente más altos en las células B de memoria atípicas en comparación con las células B de memoria clásicas y las células B *naïve* (Weiss 2009). Las células B de memoria atípicas presentan un aumento en la expresión de los receptores CD85j, CD22, CD11c, CXCR3 y T-Bet+, mientras que la expresión de CXCR4, CD62L, CXCR5 y CCR7 se encuentran disminuidas, no observándose alteraciones en las expresiones de CCR6 o CD72 (Weiss 2009). Estudios recientes mostraron que este subtipo celular es un componente normal del sistema inmunitario y ciertos patógenos intracelulares pueden producir un aumento de su frecuencia. Se ha observado que el tamaño de esta población también aumenta transitoriamente o se mantiene elevado durante las infecciones agudas por el

VIH, influenza, el virus del Ébola, malaria y tuberculosis, lo que indicaría fundamentalmente su participación en la respuesta de tipo Th1. Las células atípicas se caracterizan por tener baja expresión de CD21 y CD27 durante la infección crónica. También presentan muy bajos niveles de CD23 y CD21 (Knox 2019).

1.15 Respuesta celular B en la infección con *T. cruzi*

Distintos estudios realizados en modelos murinos con infección por *T. cruzi* y también en pacientes con enfermedad de Chagas crónica demuestran la existencia de cambios en la función y diferenciación de células B. Se ha observado una marcada pérdida de células B inmaduras en la médula ósea debido a un mayor nivel de apoptosis, como así también cambios a nivel periférico (Zuniga 2005). De este modo, una reducción de células B inmaduras en la médula ósea podría limitar la cantidad de anticuerpos y así favorecer la replicación y la cronicidad del parásito.

A partir de estudios de inmunohistoquímica realizados con muestras tomadas de bazo en ratones infectados con *T. cruzi* se observa una masiva respuesta folicular y extra folicular de células B, con secreción de anticuerpos, contrariamente a lo observado en médula ósea, donde se observa una disminución en las células $CD138^{+}B220^{+}$ (Bermejo 2011). En el bazo se observa hiperplasia como consecuencia de la activación policlonal de linfocitos B y T periféricos generada por el parásito (Reina-San-Martin 2000). La activación policlonal de linfocitos B es un mecanismo útil en etapas tempranas de la infección, porque da la posibilidad de generar anticuerpos de amplio espectro que reconocen estructuras conservadas de patógenos, pero, por el contrario, deja de ser un mecanismo efectivo durante la etapa crónica, cuando se necesita la generación de anticuerpos específicos. Se demostró que las células B1, que son muy eficientes en el control de infecciones bacterianas y virales, no jugarían un papel en el control de la replicación del parásito, dado que usando ratones BALB/c Xid (portadores de una mutación ligada al cromosoma X que impide el desarrollo de células B1) infectados con *T. cruzi* se genera una respuesta deficiente de células B junto con niveles bajos de inmunoglobulinas en suero, aunque pese a ello los ratones Xid son capaces de controlar la parasitemia (Minoprio 1991). Es por esto por lo que se llegó a la sospecha de que los linfocitos B1 —que además se caracterizan por presentar un amplio repertorio de anticuerpos con autoreactividad— serían responsables de la patología observada en los ratones inmunocompetentes (*wild type*). Varias hipótesis que se postulan incluyen que los anticuerpos estarían surgiendo o bien de las B1, o bien por reconocimiento de antígenos del parásito que comparten similitud con antígenos propios (Reina-San-Martin 2000).

En fase aguda de infección experimental con *T. cruzi* se observó que en el bazo existe mayores niveles de apoptosis relacionado con un incremento de la vía FAS-FASL en linfocitos B activos (IgG^+) (Zuniga 2002), de esta manera el parásito estaría utilizando el control hemostático regulatorio de las células B como un modo de evasión. Se sabe que los linfocitos B son capaces de presentar antígenos, ya que expresan MHCII y son capaces de modular la respuesta de las células T. Por lo general, sabemos que la presentación antigénica por parte de las células B induce anergia de células T y tiende a promover la diferenciación de células T *naïve* hacia un fenotipo Th2 antiinflamatorio, por lo que se propone que las células B tendrían funciones duales en la modulación de la inmunidad de las células T, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis inmunológica. Con relación a esto, se ha reportado que durante la infección con *T. cruzi*, los linfocitos B activados secretan GAL-1, que induce la apoptosis en células T, originando como consecuencia una caída en la producción de IFN-gamma, citocina esencial para combatir al parásito (Zuniga 2001). También se demostró que la presencia de IL-4 y GAL-3 en células B activadas de ratones infectados favorecen la diferenciación a células B de memoria, a costo de la diferenciación en células plasmáticas secretoras de anticuerpos, lo que limita la capacidad de combatir al parásito mediante la secreción anticuerpos (Acosta-Rodriguez 2004).

Se observó que en linfocitos B de ratones de la cepa BALB/C inmunizados con la proteína cruzipaína derivada de *T. cruzi* —los cuales son susceptible a sufrir eventos de autoinmunidad a nivel cardíaco—, existe una mayor resistencia de los linfocitos B a sufrir apoptosis, comparados con la respuesta observada en la cepa C57, que son resistentes a eventos autoinmunes (Pellegrini 2011). Por otro lado, utilizando ratones *knock out* muMTC57 que carecen de células B maduras, se demostró que las células B también son capaces de modular el perfil Th1 y las células T $CD8^+$ durante la etapa aguda de la infección (Cardillo 2007).

Durante el pico de activación policlonal en un modelo murino de infección, se detectó en el bazo la producción de la citocina proinflamatoria IL-17 por parte de células B. Las células B productoras de IL-17 presentaban un perfil $CD138^+$ correspondiente a plasmablastos o células plasmáticas, pero no presentaban marcadores correspondientes a centro germinal (Bermejo 2013). Los análisis de sobrevida utilizando ratones uMTC57, que no poseen células B maduras, mostró un aumento de la parasitemia y posterior aumento de la mortalidad, indicando la importancia de las células B productoras de IL-17 en el control de la infección (Bermejo 2013). Recientemente, se detectó que la estimulación con tripomastigotes genera un fenotipo particular de células B *naïve* productoras de IL-10, IL-6, IL-21 y moléculas pro apoptóticas que modulan negativamente la activación de linfocitos T CD4 (Somoza 2022). En concordancia con esto,

utilizando un anti-CD20 en un modelo experimental de infección por *Trypanosoma cruzi* con ratones C57BL/6 para depletar células B, se encontró que hay una menor respuesta e incremento en la apoptosis y disminución del número de células T $CD8^+$ totales y específicas contra el parásito, como también una marcada reducción en la frecuencia de células productoras de IL-6 e IL-17A, remarcando la importancia de las células B en la inducción de la respuesta T $CD8^+$ (Fiocca Vernengo 2020).

Realizando un mapeo de epítopes para determinar la reactividad de anticuerpos contra diferentes proteínas del parásito se detectó que varios de estos epítopes comparten secuencias consenso que les dan la capacidad de ser reconocidos por diferentes anticuerpos (Carmona 2012). Un ejemplo es la proteína transialidasa requerida para la infección del parásito, que generaría un mecanismo para evadir la respuesta humoral al presentar secuencias consenso que interactúan con los anticuerpos de manera inespecífica (Pitkovsky 2001). Otras proteínas bajo estudio que presentaron resultados similares incluyen a la cruzipaína (Schnapp 2002), la proteína B13 (Girones 2005) y proteínas ribosomales (Smulski 2006). En ensayos con ratones inmunizados con estas tres proteínas, o ratones a los cuales se les transfiere linfocitos T autoreactivos, se observan trastornos similares a los observados en pacientes con enfermedad de Chagas (Motran 1998).

La información disponible sobre la respuesta B a partir de muestras de pacientes con enfermedad de Chagas es menor. Usando sueros de individuos con enfermedad de Chagas crónica se detectó la reactividad hacia tres fragmentos de la proteína cruzipaína, siendo la más reconocida la región C-terminal de la enzima, lo que sugiere la presencia de epítopes con inmunodominancia (Martinez 1993). También se observó que la interacción con el anticuerpo no interrumpe la actividad enzimática de la enzima, es decir que el anticuerpo interactúa con regiones que no corresponden con el dominio enzimático, constituyendo un posible mecanismo de evasión para salvar la actividad de la enzima (Martinez 1993). Por otro lado, realizando un estudio de citometría de flujo en muestras de sangre obtenidas de individuos con enfermedad de Chagas crónica se describió un aumento de linfocitos B activados $CD19^+HLADR^+$ en pacientes infectados con *T. cruzi* con miocardiopatía. Sin embargo, esta observación no fue exclusiva de los individuos seropositivos para *T, cruzi* sino que también se presentó en personas seronegativas con cardiopatía dilatada (Piedras 1997).

En otro estudio se observó que una fracción proteica derivada de *T. cruzi* provoca un incremento en la frecuencia de células $CD11b^+$ B1 en individuos infectados con *T. cruzi* sin cardiopatía, en

comparación con aquellos con cardiopatía (Passos 2019). Mientras se halló un incremento en la producción de TNF-α por estos linfocitos B1 independientemente de la forma clínica, la producción de IL-10 en respuesta a estos antígenos se asoció a formas clínicas sin lesiones cardíacas aparentes. Al realizar una correlación de las células $CD11b^+$ B1 contra parámetros cardiológicos (diámetro diastólico ventricular y fracción de eyección ventricular izquierda) se observó que la fracción celular presenta correlación positiva con un buen funcionamiento cardíaco (Passos 2019). En concordancia con este estudio, otros autores observaron un incremento en la población de linfocitos B productores de IL-10 e IL-17 en pacientes crónicos infectados con *T. cruzi* (Girard 2021). La capacidad regulatoria de estos linfocitos B también se evidenció por un aumento en la expresión de la molécula regulatoria PD-L1. Los individuos infectados con *T. cruzi* en etapa crónica poseen menor frecuencia de linfocitos B de memoria $CD27^+$, IgG^+ o IgM^+, como también células plasmáticas $CD27^+$, $CD138^+$ y células B *naïve*. Pero, por el contrario, estos individuos presentan una mayor proporción de células B de memoria atípica IgG^+, IgD^- CD27-, como también células B del tipo virgen IgM^+, IgD^+ $CD27^-$ (Fernández 2014).

1.16 Hipótesis

Según nuestra hipótesis de trabajo, la tasa de cura sería superior a la actualmente reportada, y podría darse incluso manteniendo niveles detectables de anticuerpos específicos de *T. cruzi* en circulación. La infección crónica por *T. cruzi* desviaría la respuesta B específica de *T. cruzi* hacia una predominancia de células productoras de anticuerpos de corta vida (plasmablastos) y baja frecuencia de linfocitos B de memoria en circulación sanguínea, debido a la estimulación antigénica constante. Sin embargo, este proceso no impediría la generación de células plasmáticas de larga vida específicos de *T. cruzi* capaces de sobrevivir por períodos de tiempo prolongados en nichos adecuados una vez resuelta la infección. De ser así, aun ante un tratamiento exitoso, los anticuerpos específicos de *T. cruzi* producidos por células plasmáticas de larga vida enmascararían la desaparición de anticuerpos específicos de *T. cruzi* producidos por la activación constante dependiente de antígeno de los plasmablastos. Podríamos predecir, entonces, que ante un tratamiento exitoso la desaparición del estímulo antigénico induciría la desaparición de los plasmablastos de la circulación, pero no la de células plasmáticas de larga vida específicos para *T. cruzi*. Podría esperarse también que una disminución en el estímulo antigénico derivara en un aumento en el número de linfocitos B de memoria específicos para *T. cruzi* en la circulación. Similar a lo observado para la población de linfocitos T, la activación constante del sistema inmune en la infección crónica podría inducir cambios fenotípicos y funcionales en la

población de linfocitos B totales que podrían revertirse luego de un tratamiento antiparasitario exitoso.

1.17 Objetivo general

El principal criterio de eficacia terapéutica en el tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica es la seroconversión a valores negativos de los anticuerpos específicos para *Trypanosoma cruzi* mediante ensayos serológicos convencionales. Una limitación importante en este criterio es que no contempla la activación de células plasmáticas de larga vida específicas de *T. cruzi* en respuesta a la infección que podrían secretar anticuerpos independientemente de la presencia del parásito. Otra población que puede persistir independientemente del antígeno es la población de linfocitos B de memoria, los que podrían ser activados en forma específica o inespecífica y originar también una fuente de anticuerpos hacia *T. cruzi*. Así, el criterio actual de cura asume que las células productoras de anticuerpos de corta vida recientemente activadas (plasmablastos) y dependientes de antígeno representarían la única fuente de anticuerpos específicos de *T. cruzi* durante la fase crónica. Este criterio no sería correcto si existieran células plasmáticas de larga vida alojadas en la médula ósea o ganglios linfáticos, representando una fuente estable de anticuerpos específicos de *T. cruzi*, incluso luego de la eliminación completa del parásito como consecuencia de un tratamiento farmacológico exitoso. Dada la evidencia que muestra la capacidad del sistema inmune de activar células plasmáticas de larga vida y linfocitos B de memoria en respuesta a diversos patógenos, y que estas células son capaces de sostener en forma constante los niveles de anticuerpos específicos durante décadas luego de la eliminación de la infección, resulta relevante investigar la interrelación de las distintas poblaciones celulares de linfocitos B en respuesta a la infección crónica con *T. cruzi* y luego del tratamiento específico.
El objetivo principal de este proyecto es cuantificar los niveles de linfocitos B específicos para *T. cruzi* y totales productores de anticuerpos en circulación (plasmablastos) y de memoria en individuos con enfermedad de Chagas crónica, y determinar si los niveles de estas poblaciones B cambian luego del tratamiento específico en relación con la evolución serológica. Se analizará también el fenotipo de linfocitos B específicos para *T. cruzi*.

1.18 Objetivos específicos

A partir de muestras de células mononucleares periféricas (CMPs) y sueros de pacientes adultos con enfermedad de Chagas crónica se evaluará:

- Los niveles de células productoras de anticuerpos (plasmablastos) y linfocitos B de memoria (productores de anticuerpos luego de ser activados) específicos para *T. cruzi* en la circulación de pacientes con enfermedad de Chagas crónica mediante ensayos de ELISPOT.

- El grado de diferenciación y activación de linfocitos B específicos para *T. cruzi* mediante el uso de proteínas recombinantes marcadas con fluorocromos mediante citometría de flujo.
- El grado de diferenciación y activación de linfocitos B totales mediante ensayos de citometría de flujo.
- El perfil funcional de linfocitos B totales mediante la producción de IL-6, IL-10 y TNF-α y el fenotipo de los linfocitos B productores de citocinas.
- Las variaciones en los niveles de plasmablastos y linfocitos B de memoria específicos para *T. cruzi* y en el fenotipo de linfocitos B totales luego del tratamiento con benznidazol y su asociación con los cambios en los niveles de anticuerpos específicos medidos por serología convencional y ensayos de multiplex.

En un grupo de niños infectados con *T. cruzi* se evaluará:

- Las variaciones en los niveles de plasmablastos y linfocitos B de memoria específicos para *T. cruzi* y en el fenotipo de linfocitos B totales después del tratamiento con benznidazol y su asociación con los cambios en los niveles de anticuerpos.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Diseño experimental

A- Caracterización de linfocitos B específicos para *T. cruzi* y totales en individuos con enfermedad de Chagas crónica.

Para evaluar la respuesta celular B específica para *T. cruzi* se cuantificó el número de CSAs y las células B de memoria por ELISPOT. El análisis de marcadores para determinar el fenotipo y la función de linfocitos B totales, así como la detección de células B específicas usando proteínas recombinantes del parásito marcadas con fluorocromos se realizó mediante citometría de flujo. Para ello, se obtuvieron CMPs de individuos adultos y niños infectados con *T. cruzi* y como controles no infectados se recolectaron muestras de individuos adultos y niños no infectados. El fenotipo de la población total de linfocitos B se evaluó mediante la expresión de marcadores específicos para linfocitos B *naïve* ($CD19^+$, $CD20^+$, $CD21^+$, $CD27^-$), de memoria atípica ($CD19^+$, $CD20^+$, $CD21^-$, $CD27^-$), de memoria en reposo ($CD19^+$, $CD20^+$, $CD21^+$, $CD27^+$), de memoria activada ($CD19^+$, $CD20^+$, $CD21^-$, $CD27^+$) y plasmablastos ($CD19^+$, $CD3^-$, $CD27^+$, $CD38^{hi}$). La función B se determinó midiendo TNF-α, IL-6 e IL-10 (Figura 4).

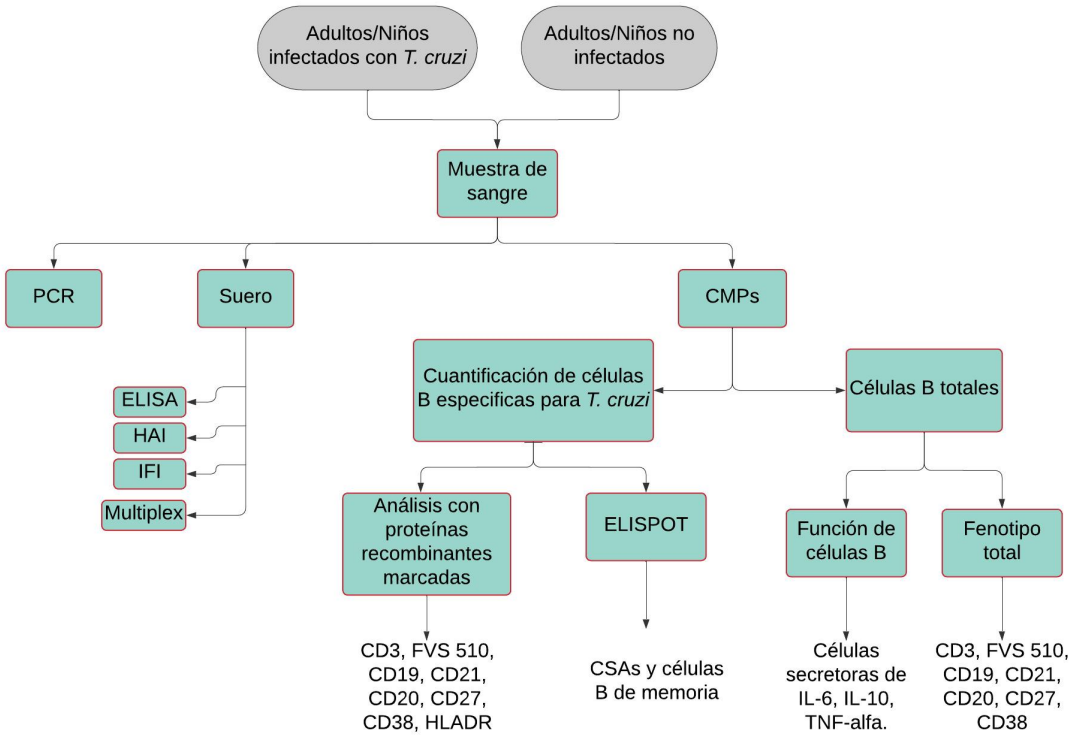

Figura 4. Representación de los ensayos realizados a partir de muestras de individuos infectados con *T. cruzi.* Células secretoras de anticuerpos, CSAs.

B- Seguimiento de individuos infectados con *T. cruzi* tratados con benznidazol.

Posteriormente, evaluamos los cambios en la respuesta celular B específica para *T. cruzi* y en el fenotipo de linfocitos B totales luego del tratamiento etiológico en individuos adultos y niños infectados con *T. cruzi* utilizando los ensayos descriptos en el apartado anterior (Figura 5). En cuanto a la respuesta humoral, se midieron los anticuerpos específicos hacia *T. cruzi* por los ensayos de serología convencional, ELISA, hemaglutinación indirecta (HAI) e inmunofluorescencia indirecta (IFI), y también a través de la técnica no convencional de multiplex, empleando un grupo de proteínas recombinantes del parásito. Para este objetivo, se tomaron muestras de CMPs y suero previamente al inicio del tratamiento (t0) y a distintos tiempos postratamiento hasta un tiempo de seguimiento de 9 o 10 años. La presencia de ADN de *T. cruzi* se evaluó por qPCR antes del tratamiento, a los 12 meses postratamiento y al final de seguimiento. También se incluyó un grupo de muestras trasversales de pacientes tratados con benznidazol y que alcanzaron la seroconversión en 3/3 o 2/3 técnicas convencionales, con un tiempo de seguimiento entre 5-14 años postratamiento.

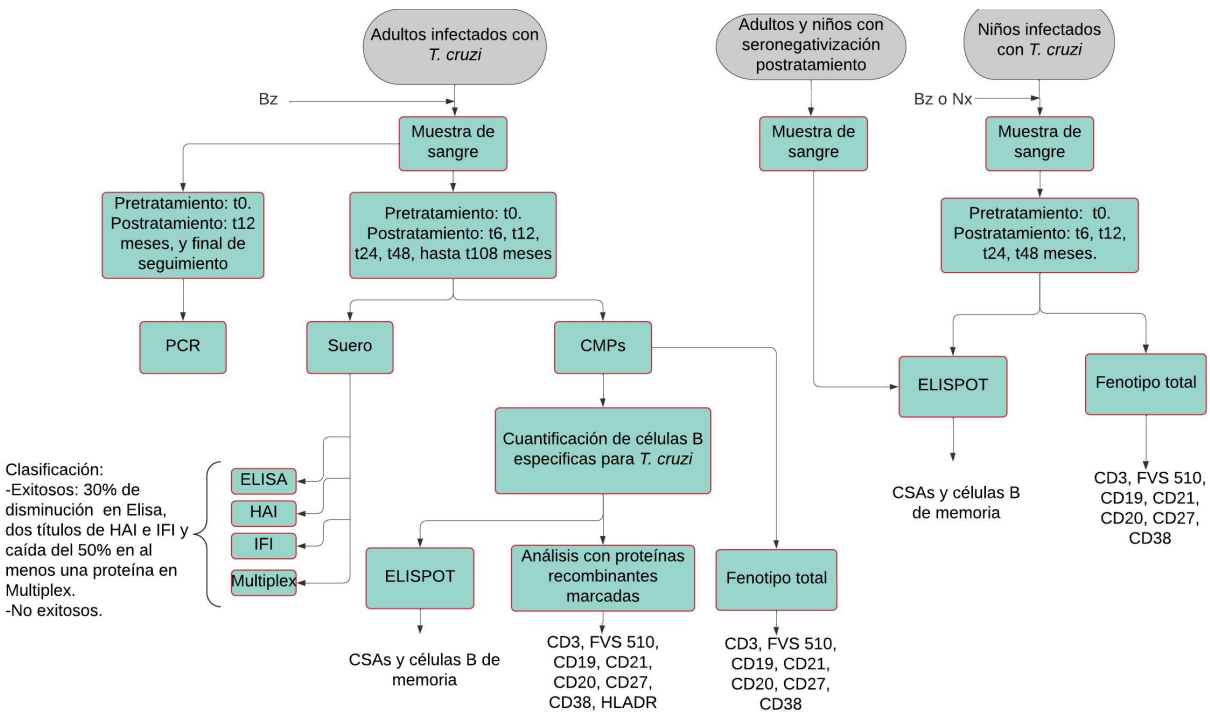

Figura 5. Representación de los ensayos realizados a partir de muestras de individuos infectados con *T. cruzi* tratados con benznidazol y con seguimiento clínico e inmunológico. Benznidazol, BZ; células secretoras de anticuerpos, CSAs.

2.2 Selección de la población de estudio

Individuos adultos con serología positiva y negativa para la infección por *Trypanosoma cruzi* fueron incorporados en la Sección de Chagas del Hospital Interzonal de Agudos Eva Perón en Buenos Aires, Argentina. El protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética del mencionado hospital. Los participantes adultos firmaron consentimiento informado y los niños mayores a 5 años presentaron consentimiento parental y asentimiento previamente a su inclusión en el estudio, siguiendo los lineamientos del Ministerio de Salud de la Nación.

La infección por *T. cruzi* se determinó por las tres pruebas serológicas convencionales, IFI, HAI y ELISA (TDR/WHO 2012), en el Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chaben, Argentina. Los pacientes con al menos dos pruebas serológicas positivas fueron considerados infectados (TDR/WHO 2012). A todos los individuos incluidos en el estudio se les realizó una evaluación física, electrocardiograma (ECG) y ecocardiograma para posteriormente determinar la forma clínica de acuerdo con la clasificación de Kuschnir modificada (Kuschnir 1985; Viotti 2011). Los participantes pertenecientes al Grupo 0 (G0) presentan un electrocardiograma, radiografía de tórax y ecocardiografía normales; los participantes pertenecientes al Grupo 1 (G1) presentan hallazgos normales en la radiografía de tórax y ecocardiografía, pero anormalidades en el electrocardiograma; los participantes del Grupo 2 (G2) presentan anomalías electrocardiográficas y agrandamiento del corazón; y los participantes del Grupo 3 (G3) presentan anomalías en el electrocardiograma, agrandamiento del corazón y evidencia clínica o radiológica de insuficiencia cardíaca. Se incluyeron un total de sesenta y ocho adultos infectados por *T.cruzi* no tratados de 24 a 65 años y 13 adultos no infectados en el mismo rango de edad.

También se incorporó un grupo de 25 niños infectados con *T. cruzi* y nueve niños no infectados que concurren para diagnóstico para la enfermedad de Chagas al Instituto Nacional de Parasitologia Dr. Mario Fatala Chaben (Tabla 1). El tratamiento en pacientes adultos consistió en benznidazol, 5 mg/kg por día durante 30 días, mientras que los niños fueron tratados con 5 mg/kg por día de benznidazol o 10 mg/kg por día de nifurtimox durante 60 días (Sosa Estani 1998; Altcher 2003). Se considera una respuesta serológica positiva al tratamiento cuando existe una disminución significativa en los títulos de anticuerpos específicos para *T. cruzi*, determinada por al menos dos ensayos serológicos convencionales (considerando una reducción del 30 % en los títulos de ELISA y dos diluciones en IHA o IIF) o una reducción del 50 % en la reactividad de al menos una proteína en el ensayo multiplex (Viotti 2011. No se detectó falla terapéutica por la técnica de PCR descripta en el apartado 2.4 en ninguno de los pacientes que recibieron

tratamiento. Las características clínicas de los individuos adultos y niños infectados con *T. cruzi* que recibieron tratamiento etiológico se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los individuos infectados con *T. cruzi* tratados con benznidazol o nifurtimox.

Participantes con tratamiento etológico	Sexo		Rango de edad (mediana), años	Rango de tiempo de seguimiento (mediana), años
	F	M		
Adultos				
G0	17	14	25-51 (38)	36-120 (64)
G1	4	2	29-54 (43)	52-98 (96)
Niños	11	14	5-16 (11)	24-96 (48)

Nota. * Seis niños fueron tratados con nifurtimox. Los individuos del Grupo 0 (G0) tuvieron resultados normales en electrocardiografía, radiografía de tórax y ecocardiografía; los individuos del Grupo 1 (G1) presentaron hallazgos normales en la radiografía de tórax y la ecocardiografía, pero resultados electrocardiográficos anormales.

2.3 Recolección de CMPs y suero

Aproximadamente 50 ml de sangre fue extraído utilizando tubos Vacutainer con heparina (BD Bioscience, USA). Las CMPs fueron aisladas por centrifugación por gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque (Amershan/GE Healtcare, USA) y almacenadas en nitrógeno líquido a $1{,}5x10^7$ células/ml en suero fetal bovino conteniendo 10% de DMSO. Previo a cada ensayo las células fueron descongeladas y lavadas en medio RPMI 1640 (Gibco, USA) con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 unidades/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina, 2mM L-glutamina y 10 mM de Hepes (Sigma, USA). El recuento y la viabilidad de las células fueron evaluados por tinción con azul de tripan. Para la obtención del suero, 10 ml de sangre se dejaron coagular a temperatura ambiente y fueron centrifugados a 1000g por 15 minutos. Otros 5 ml adicionales fueron utilizados para análisis de PCR para *T. cruzi*, como se describe en el próximo apartado. Debido a la disponibilidad de las muestras no se realizaron todos los ensayos con todas las muestras.

2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction, PCR)

Con el fin de amplificar el ADN de *T. cruzi* en muestras de pacientes, se tomaron 5 ml de sangre y se mezclaron con igual volumen de guanidina clorhidrato 6M y EDTA 0.2M a pH 8 (GEB) (Sigma Aldrich, USA). Se mantuvieron durante una semana en oscuridad a temperatura ambiente y luego a 4°C hasta su utilización. Para aislar el ADN se usó un volumen de 0.2 ml en mini-columnas para purificación de ADN (High pure PCR template preparation kit, Roche, Suiza), de acuerdo al protocolo recomendado por el proveedor. Un control interno de extracción de ADN (2 ng) fue incluido para cada muestra de GEB. La cuantificación del ADN parasitario fue realizada por duplicado en un termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems, USA), amplificando una secuencia satélite de *T. cruzi* flanqueada por los oligonucleótidos Sat Fw y Sat Rv usando el kit comercial SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal (Invitrogen, USA). , Cinco microlitros de ADN en un volumen final de reacción de 20 µl fueron sujetos a amplificación con el esquema siguiente: 50°C por 2 min; 95°C por 10 min y 40 ciclos (95°C por 15 s, 60°C por 60 s). El clon de *T. cruzi* CL Brener fue utilizado para realizar la curva estándar de detección, agregando 105 epimastigotes/ml en una mezcla de sangre negativa que consta de guanidina sola, 10 veces diluida, y extraído como se mencionó anteriormente. El límite del ciclo para cada muestra luego del procedimiento de PCR en tiempo real nos permite interpolar los equivalentes de parásitos de la curva estándar de concentraciones conocidas de parásitos. El control interno fue un ADN de plásmido de bacterias linearizado, también amplificado con el mismo perfil térmico. En cada corrida de qPCR se incluyeron varios puntos de la curva de parásitos, dos controles positivos, dos controles negativos y ADN sin templado. El límite de detección del método, calculado por la curva de características de funcionamiento del receptor (ROC), es de 0,14 Pe/ml (Bua 2013).

2.5 Lisado de epimastigotes de *T. cruzi*

Se siembran el día cero con epimastigotes de la cepa Tulahuen, stock Tul2. A los 6 días se observan al microscopio óptico y se recoge el material en frascos de 500 ml. Se centrifuga a 7500 rpm en una centrífuga Sorvall con rotor GS3 durante 15 minutos. Posteriormente see realizan dos lavados con solución fisiológica estéril y se centrifuga a 7500 rpm durante 15 minutos. El último lavado se recolecta en tubos de 50 ml y se centrifuga en el rotor SS34 (16000 rpm), agregando a la mezcla inhibidores de proteasa (PMSF concentración: 100ug/ml). El precipitado de epimastigotes obtenido en el último lavado se lleva a una dilución de 1/10 con solución fisiológica. Todas las operaciones de centrifugado y precipitación se realizan a 4°C. El producto obtenido se coloca en un Omnimixer (Sorvall Omnimixer 17106) para provocar la

ruptura o lisis a 7000 rpm realizando 5 pulsos de 1 minuto con descansos intercalados de 30 seg. Luego se coloca la solución resultante en el ultrasonido (Branson B-12) generando 5 pulsos de 20 segundos con descansos intercalados de 30 segundos. Posteriormente se centrifuga a 30000 g/ durante 30 minutos usando un rotor SS34 (16000 rpm) en tubos de 50 ml. Del resultado se separa el sobrenadante (S 30), descartando el tercio inferior, y se toman alícuotas en tubos conteniendo 2 ml de S 30 cada uno que serán almacenan en freezer a -70°C (Cura 1993).

2.6 Proteínas recombinantes de *T. cruzi*

Para la obtención de las proteínas recombinantes utilizadas en el ensayo de multiplex (Tabla 2), se procedió como se describe a continuación. Se transformaron bacterias *E.coli* BL21 competentes con los diferentes plásmidos (Pxp1 o Ptd4) con el inserto correspondiente, se incubaron en hielo durante 30 min y luego se hizo un shock térmico a 42°C de 45 segundos, pasándose nuevamente a hielo por 2 minutos. Por último, se agregaron 450 µl de LB/SOC (medio Luria-Bertani, Sigma, USA) y se incubó por 60 min a 37°C seguido por el plaqueado de las bacterias en placas de Petri con LB, ampicilina (150 mg/L) y cloranfenicol (34 mg/L) durante toda la noche. Se tomaron algunas de las colonias crecidas y se cultivaron en 5 ml de LB con antibiótico. Este cultivo iniciador se escaló a uno de 50 ml con Magic media (Thermofisher, USA) con antibiótico y se incubó durante toda la noche a 37°C. El cultivo se centrifugó a 4000g por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 10 ml de buffer Z (8M de urea, 10 mM de imidazol). A continuación se realizaron 3 ciclos de congelado y descongelado (-80°C a temperatura ambiente), se sonicó al 40% por 8 minutos (20 segundos de sonicado y 10 segundos de descanso) y se centrifugó a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se puso en contacto con 2 ml de resina TALON metal affinity (Clontech, USA) y se dejó en rotación durante toda la noche a 4°C. Luego se colocó en una columna de purificación y se lavó con Buffer Z 10mM de imidazole. Las proteínas se eluyeron con buffer Z 250 mM de imidazole y se dializaron con PBS, determinándose posteriormente la concentración con el reactivo de Bradford (BIO-RAD, USA) (Cooley 2008).

Tabla 2. Proteínas recombinantes de *T. cruzi* purificadas para el ensayo de multiplex.

Tc00 Id	Nombre	Abreviatura
Tc00.1047053510433.20 Tc00.1047053504277.11 Tc00.1047053504157.130	Proteínas TolT3	ANOF-F10
Tc00.1047053506635.130	Proteína hipotética conservada	ANOH-G10
Tc00.1047053511633.79	Proteína asociada a microtúbulos	ANOL-E02
Tc00.1047053507029.30	Proteína de shock térmico de 70kDa, precursor de proteína mitocondrial	FAB-A04
Tc00.1047053508355.250	Subunidad proteica putativa acídica ribosomal 60s	KN107
Tc00.1047053511215.119	Proteína putativa Rod paraflagelar de 69 kDa	KN117
Tc00.1047053508461.140	Proteína de unión a poli(A)	KN80
Tc00.1047053506749.20	Proteína flagelar de unión a calcio	KN122
Tc00.1047053507547.90	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	KN104
n/e	Proteína verde fluorescente	GFP

Nota. La proteína GFP se utilizó como control en los ensayos de multiplex.

2.7 Determinación de la concentración proteica

Para determinar la concentración de proteínas obtenida luego de la preparación del lisado y de la purificación de proteínas de *T. cruzi* se utilizó un método adaptado de la técnica descripta por Bradford en 1976 (Bradford 1976). A 10 µL de cada muestra se le agregaron 200 µL del reactivo de Bradford y se midió la densidad óptica a 595 en un espectrofotómetro. Las muestras fueron analizadas por duplicado y los valores obtenidos fueron interporlados a partir de una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina a fin de determinar la concentración proteica.

2.8 Evaluación de anticuerpos específicos para *T. cruzi* empleando el ensayo de multiplex

La presencia de anticuerpos específicos para un panel de ocho proteínas recombinantes derivadas de *T. cruzi* en sueros obtenidos antes y después del tratamiento con benznidazol se evaluaron en un formato basado en Luminex (Cooley 2008) de cada una de estas mezclas se sembraron en una placa de 96 pocillos, con filtro de 0.65µm (Merk Milipore, USA). Posteriormente, se filtró por vacío y se sembraron 100µl de una dilución 1:500 de cada muestra de suero en PBS con caseína y se incubó por 1 hora. Seguidamente se filtró por vacío, se realizaron dos lavados con 200 µl de PBS con caseína y se agregó el anticuerpo de detección incubándose por 1.5 horasFinalizada la incubación se leyó la placa en un lector Bio-Plex (BIO RAD, USA). Para cada muestra de suero, se calculó la relación entre la intensidad media de

fluorescencia (MFI, *mean fluorescence intensity*) para cada antígeno y la reactividad hacia la proteína GFP como control negativo. Los valores por encima del promedio más cuatro desvíos estándar, de un mínimo de 16 muestras provenientes de individuos no infectados evaluadas en el mismo ensayo e individualmente determinados para cada antígeno, fueron considerados como reactividad positiva.

2.9 Ensayo ELISPOT o inmunoabsorción unida a enzimas (*enzime linked immunosorbent spot*) para células B.

El ensayo de ELISPOT para la detección de células B se realizó utilizando el kit IgG Basic Kit (cat# 3850-2 H, Mabtech, Suiza, (Figura 6) de la empresa Mabtech. Un lisado derivado de *T. cruzi* (10 μg/ml, Cura, 1993) utilizado como antígeno en los ensayos de ELISA in house realizados en el INP Fatala Chaben, proteínas recombinantes (10 μg/ml, Cooley 2008) y péptidos solapados (10 μg/ml) de *T. cruzi* se dispensaron en placas filtrantes estériles Multiscreen-IP de 96 pocillos de membrana PVDF (Millipore Corp, EE. UU.) para medir el número de CSAs específicas de *T. cruzi* (Dosenovic 2009; Sebina 2012). Para medir el número de células secretoras totales se dispensó un anticuerpo anti-IgG provisto por el mismo kit y como control negativo se utilizó hemocianina (Hemo) al 1%. La placa se conservó por 12 hs. a 4° C. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBS estéril y se bloquearon con medio RPMI-1640 / FSB al 10% durante 2 horas a temperatura ambiente. Las CMPs fueron descongeladas y resuspendidas en en medio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, Reino Unido) suplementado con estreptomicina, glutamina y suero bovino fetal al 10% (Natocor, Argentina) y ajustando la concentración a 1 x 10^6 células/ml Se añadieron 500.000s CMPs en los pocilconteniendo antígenos derivados de *T. cruzi* y BSA, y 50.000 CMPs en los los pocillos conteniendo el anticuerpo anti-IgG.

Para la detección de células B de memoria específica de *T.cruzi*, las CMPs se estimularon con una mezcla de 0,5 μg/ml de R848 y 10 ngr/ml de IL-2 durante 72 horas a 37°C y 5% CO_2 (Figura 6C). La placa Multiscreen-IP se sembró con lisado de *T. cruzi* a 35 μg/ml y toxoide tetánico a 20 μg/ml como control positivo. Posteriormente, se dispensaron 250.000 células/pocillo conteniendo antígenos derivados de *T. cruzi* para inducir la producción de CSAs por las células B de memoria y 50.000 células/pocillo conteniendo el anticuerpo anti--IgG para medir memoria total. Las placas se mantuvieron durante 18-20 horas a 37°C y CO_2 al 5%. Cada condición se realizó por duplicado. Para la detección, se realizaron lavados y posteriormente se agregó un anticuerpo anti-IgG marcado con biotina por 2 hs, seguido por un conjugado de mAb estreptavidina-peroxidasa (Mabtech, Nacka Strand, Suecia). Para contar las CSAs, se utilizó un

analizador de imágenes de ELISPOT automatizado (Cellular Technology Limited, Hong Kong, China).

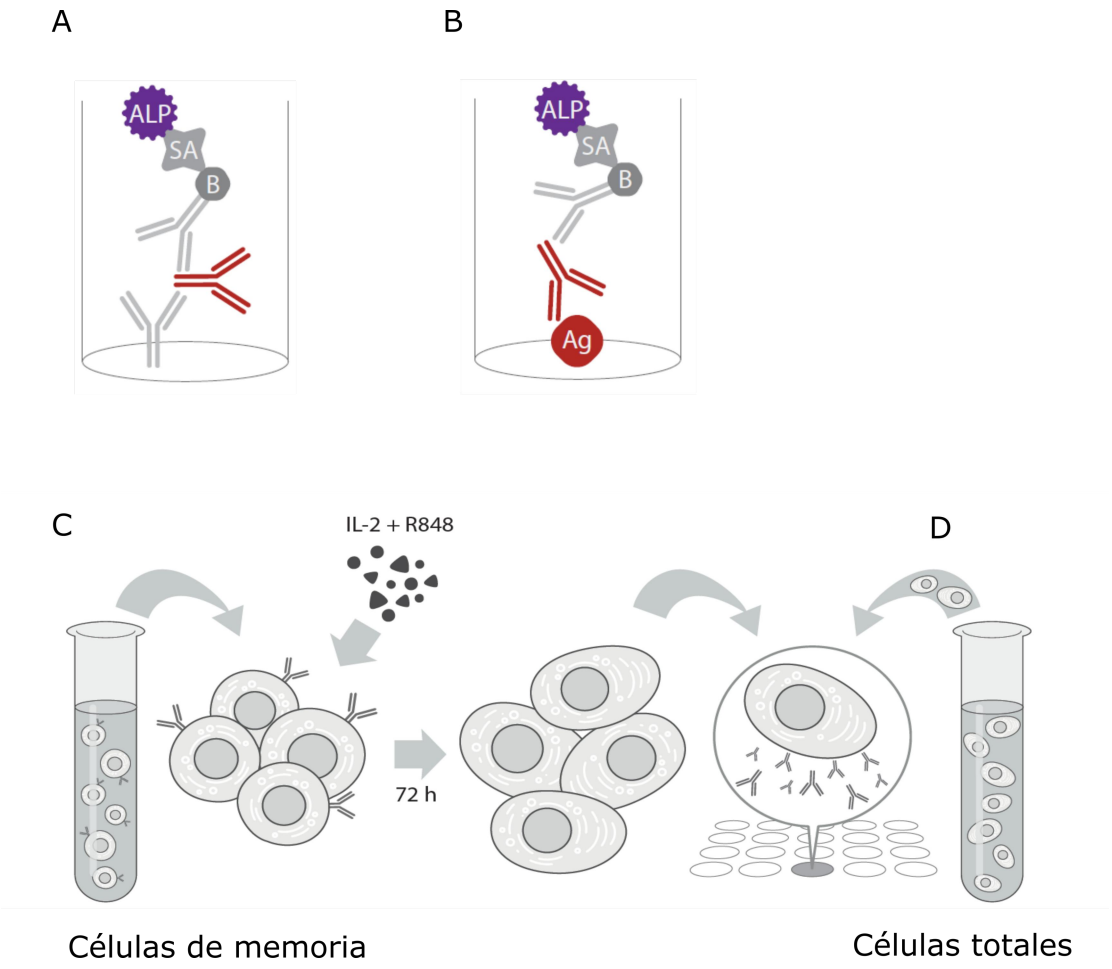

Figura 6. Representación del ensayo ELISPOT. En el pocillo se adhiere IgG total (A) o distintos tipos de antígenos (B). Las células se siembran utilizando los estímulos policlonales IL-2 y R848 para generar células de memoria (C) o directamente luego de ser aisladas desde la sangre (D). (Figura modificada de Mabtech "B cell profilling ELISPOT")

2.10 Producción de proteínas recombinantes específicas de *T. cruzi* marcadas y citometría de flujo.

Se conjugaron individualmente proteínas recombinantes de *T. cruzi* purificadas con fluorocromos DyLight 550 o DyLight 650 (Microscale Kit ThermoScientific, EE. UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Loghman Salimzadeh, 2018). Se mezclaron 100 µl de 1 µg/ml de proteína en combinación con 8 µl de buffer borato en cada tubo de reacción con DyLight 550 o DyLight650 y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Después de

la incubación, las proteínas marcadas se purificaron utilizando la resina de purificación incluida en el kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Se evaluaron $3x10^6$ células de CMPs para las proteínas marcadas con fluorescencia ANOL-E02, FABA, KN80 y KN104 (1 µgr) junto con los anticuerpos monoclonales CD19 Brilliant Violet (BV) 510, CD10 PE-CF594, CD3 BV605 CD27 BV711, CD21 BV421, CD38 PE-Cy7, HLA-DR Alexa Fluor 700 y un marcador de viabilidad marcado con eFluor 780 durante 30 min a 4 ° C. Los detalles de los anticuerpos utilizados se proporcionan en la Tabla 3 Se adquirieron aproximadamente un millón de eventos por muestra en un citómetro de flujo FACSAria II (BD Biosciences, EE. UU.). La tinción con 1 µg de proteína fue adecuada para detectar células B específicas de *T. cruzi* en sujetos infectados por *T. cruzi* con un background bajo en individuos no infectados (Figura 7). Los linfocitos se analizaron en función de forward-scatter, seguidos por forward-scatter area vs. forward-scatter height para la discriminación de dobletes. Los análisis posteriores se realizaron seleccionando células vivas (e-Fluor 780^- o $FVS510^-$). A continuación, se evaluaron las frecuencias de linfocitos B específicos de ANOL-E02 y KN104 en linfocitos B maduros ($CD19^+CD10^-CD3^-$) y linfocitos T $CD3^+CD19^-$ midiendo la expresión de DyLight 550 y DyLight 650 (Figura 7). Considerando la reactividad de fondo en individuos no infectados se calculó la línea de corte como la mediana más dos desviaciones estándar y la presencia de al menos 10 eventos. Para el análisis del fenotipo de células B específicas para las proteínas recombinantes de *T. cruzi*, se seleccionaron muestras con al menos 50 eventos.

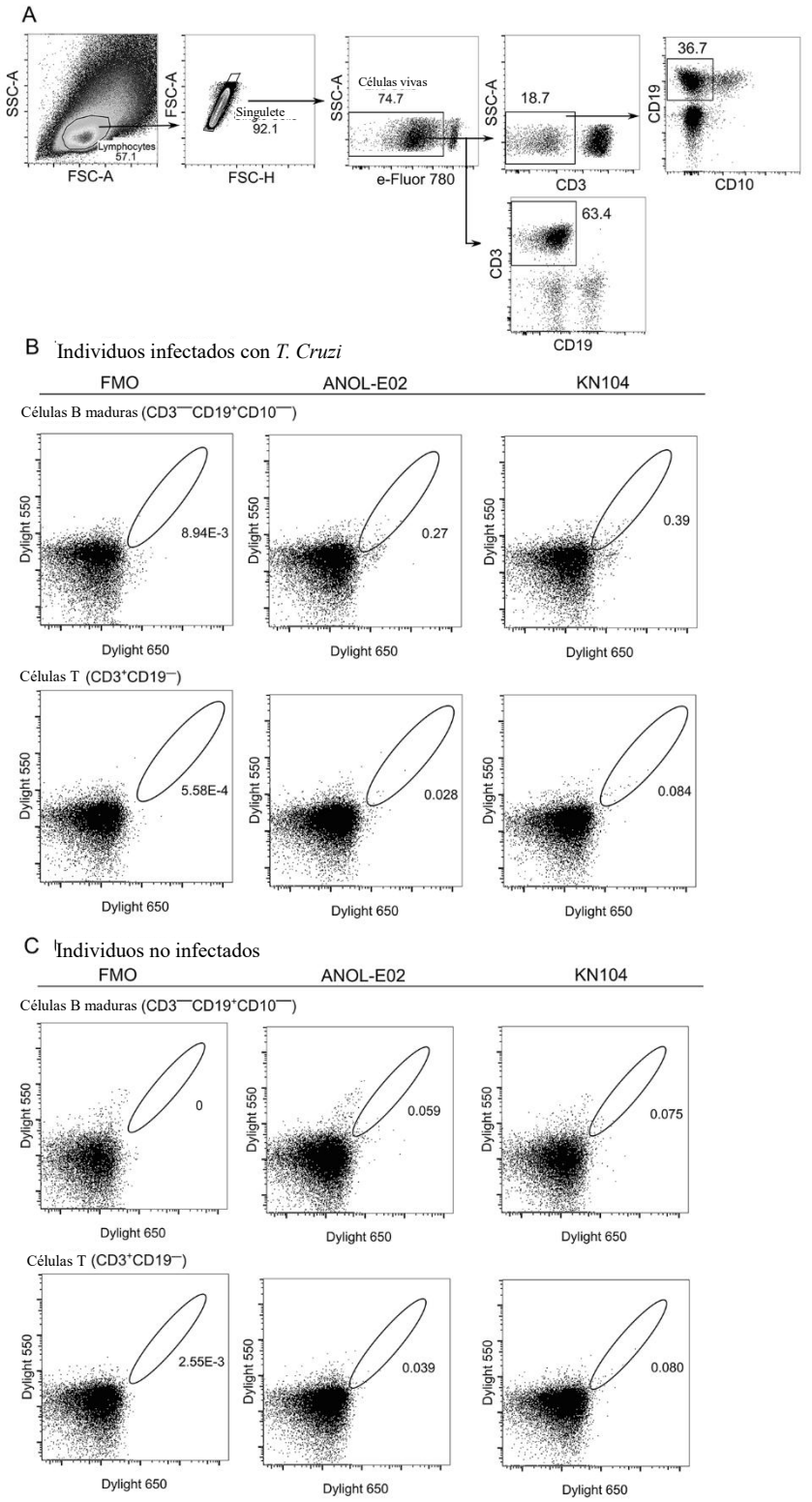

Figura 7. Estrategia para evaluar las células B específicas de *T. cruzi* en CMPs de individuos con enfermedad de Chagas crónica. Las CMPs de individuos infectados y no infectados por *T.cruzi* se tiñeron con anticuerpos monoclonales para la tinción eFluor Fixable Viability 780 (e-Fluor 780), CD3, CD10 y CD19, y las proteínas de *T. cruzi* ANOL-E02 y KN104 marcadas con fluorescencia y se analizaron mediante citometría de flujo. Los linfocitos

se seleccionaron en función de forward-scatter, seguidos forward-scatter area vs. forward-scatter height para la discriminación de dobletes (células individuales). Los análisis posteriores se realizaron seleccionando células vivas (e-Fluor 780). A continuación, las frecuencias de las células B doble positivas para DyLight 550 y DyLight 650 reconociendo ANOL-E02 y KN104 se evaluaron en células B maduras ($CD19^{+}CD10^{-}CD3^{-}$) y en células T $CD3^{+}CD19^{-}$ (A). Datos representativos del patrón de expresión de ANOL-E02 y KN104 según controles de fluorescencia menos uno (FMO) en células B maduras y células T de un individuo infectado por *T. cruzi* (B) y en un control no infectado (C).

2.11 Cuantificación de linfocitos B productores de citocinas y su fenotipo después de la estimulación policlonal.

Para determinar la capacidad funcional y el fenotipo de los linfocitos B se tomaron $4x10^6$ CMPs/pocillo las que fueron estimulados con 1 μg/ml de R848 (Invitrogen, USA) o con RPMI por 16-20 horas en presencia de Brefeldina A en estufa con CO_2 al 5%. Una vez terminado el tiempo de incubación, las células fueron recolectadas y teñidas con CD3, FVS 510, CD19, CD21, CD27, HLADR (Tabla 3) por 30 min en heladera. Finalizado el tiempo de tinción se lavó dos veces con PBS 3% SFB, las células fueron fijadas y permeabilizadas con la solución Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, USA) e incubadas por 15 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados Perm Wash (BD Biosciences, USA), y las células se incubaron con los anticuerpos anti IL-10, IL-6 y TNF-α (Tabla 3) por 30 minutos en heladera. Finalizada la incubación, se realizaron dos lavados con Perm Wash y se procedió a fijar las células con paraformaldehído 1% por 15 minutos seguido por un último lavado con Perm Wash. Aproximadamente, 600.000 eventos fueron adquiridos por muestra en un citómetro Facs AriaII (INIGEM Hospital de Clínicas, Buenos Aires, Argentina). El análisis se realizó con el programa FlowJo (version 10.8.0, Tree Star Inc, USA). La población de linfocitos, expresando los distintos marcadores, se determinó mediante el uso de FMOs y la utilización de CMPs sino estimuladas. Para establecer los valores de corte para las células B productoras de citocinas, se calculó el promedio de las respuestas de las células B específicas de *T. cruzi* más tres desvíos estándar en donantes no infectados. Los perfiles de coexpresión de las citocinas fueron determinados empleando la función de “Boolean gating” del programa Flow Jo (versión 10.8.0, Tree Star Inc, USA).

2.12 Fenotipo células B totales.

El fenotipo de linfocitos B totales (Sanz 2019) se evaluó en individuos infectados con *T. cruzi* previa y posteriormente a recibir el esquema completo con benznidazole. Para ello, se tomaron un 1.5 x 10^6 de CMPs que fueron incubadas en heladera con una combinación de anticuerpos monoclonales anti-CD3 PerCP, CD19 APC, CD38 PE, CD27 FITC, CD20 PerCP y CD21 PE junto con el marcador de viabilidad Fixable Viability Stain 510 (FVS510) por 30 min. Posteriormente se llevaron a cabo dos lavados con PBS suplementado con 3% SFB (suero fetal bovino) y centrifugando 5 min a 2000 rpm. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 1% por 15 minutos y lavadas nuevamente con PBS 3% SFB previo a la adquisición en el citómetro. Se adquirieron aproximadamente 500,000 eventos por muestra en el citómetro FACSAria II (INIGEM Hospital de Clínicas, Buenos Aires, Argentina) y los datos fueron analizados con el programa FlowJo (version 10.8.0, Tree Star Inc, USA).

Tabla 3. Anticuerpos usados para la marcación de superficie e intracelular

Especificidad	**Fluorocromo [A]**	**Clon [B]**
CD3	APC-eFluor 780	OKT3
CD3	PerCP	SK7
CD3	Brilliant Violet 605	OKT3
CD10	PE-CF594	HI10a
CD19	APC	HIB19
CD19	Brilliant Violet 510	HIB19
CD20	PerCP	L27
CD21	FITC	B-ly4
CD21	Super Bright 600	HB5
CD21	Brilliant Violet 421	B-ly4
CD27	PE	M-T271
CD27	FITC	M-T271

CD27	BB515	M-T271
CD27	Brilliant Violet 711	O323
CD38	PE	HIT2
CD38	PE-Cy7	HB-7
Fixable Viability Stain 510	N/A	N/A
eFluor 780 Fix Viability	N/A	N/A
IL-6	Brilliant Violet 421	MQ2-13A5
IL-10	Brilliant Violet 711	JES3-9D7
TNF	PeCy7	MAb11
HLA DR	Alexa Fluor 700	L243
HLA DR	Alexa Fluor 700	L243
HLADR	Brilliant Violet 650	G46-6

Nota. [A] Aloficocianina (APC), Peridinina clorofila (PerCP), Fluoresceina isocianato (FITC), Ficoeritrina (PE). B Todos los anticuerpos fueron comprados a BD Biosciences (USA).

2.13 Análisis estadístico

La distribución normal se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Se aplicó la prueba de exactitud de Fisher para evaluar diferencias entre proporciones, y la prueba U test Mann-Whitney o la prueba t de Student para comparar dos grupos independientes, mientras que la prueba de Kruskal-Wallis y se utilizó ANOVA para comparaciones múltiples. Los valores de los cultivos celulares no estimulados y estimulados se compararon utilizando una prueba de Wilcoxon pareada. Los cambios posteriores al tratamiento a lo largo del tiempo se evaluaron utilizando un modelo mixto lineal con simetría compuesta, con el tiempo como un valor fijo y el resultado serológico del tratamiento como un valor de interacción. El análisis de supervivencia se realizó utilizando la prueba de Log-rank test. Un valor de p de dos colas $< 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism v8.0 e IBM SPSS® Statistics v23.0 (IBM Corp, USA).

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Puesta a punto de la técnica ELISPOT para la detección de CSAs y células B de memoria

Con el objetivo de detectar CSAs específicas para *T. cruzi*, el primer paso fue la puesta a punto de la técnica de ELISPOT detallada en materiales y métodos, para la que se utilizaron distintos antígenos de *T. cruz*i, entre los que se encuentran lisado, proteínas recombinantes y péptidos yuxstapuestos de proteínas de *T. cruzi.* Los diferentes tipos de antígenos se evaluaron en un rango de concentración entre 1-50 µg/ml. Además se utilizó CMPs en un rango entre 5000-500,000 células. El tiempo de incubación testeado durante el ensayo fue entre 5 y 20 h. La Tabla 4 muestra el total de las condiciones ensayadas, así como las que fueron seleccionadas como las óptimas para realizar los posteriores ensayos (Tabla 4. Para la puesta a punto del ensayo, se utilizaron CMPs de individuos con infección crónica con *T. cruzi* y controles no infectados, y se calculó un valor de corte para las CSAs y las células B de memoria basados en los valores medios obtenidos en individuos no infectados sumando dos desviaciones estándar. La Figura 8 muestra una captura ejemplificando lo que se obtuvo en los ensayos de ELISPOT utilizando las diferentes condiciones, tanto para la detección de CSAs como para linfocitos B de memoria (Figura 8).

Tabla 4. Condiciones testeadas y finales para la realización del ELISPOT para detección de células B específicas para *T. cruzi.*

Población de linfocitos B		Antígenos de *T. cruzi*			Controles			Tiempo de incubación
		Lisado	Proteinas recombinantes	Péptidos yuxtrapuestos	Hemocianina	Toxoide tetánico	IgG Total	
Memoria (Activación de CMPs por 3 días)	Concentración de Antigeno	1, 10, 25, 35 y 50 µg/ml	5, 10, 25, y 50 µg/ml	1.25, 2.5, 5, 10 y 25 µg/ml	50 µg/ml	20 µg/ml	15 µg/ml	5-16 hs
	Número de CMPs	200000-500000					5000, 10000, 25000, 50000, 150000, 300000	
Condiciones Finales	Concentración de Antigeno	35 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	20 µg/ml	15 µg/ml	16 hs
	Número de CMPs	250000	500000				50000	
ASCs (CMPs sin estimular)	Concentración de Antigeno	1, 10, 25, 35 y 50 µg/ml	5, 10, 25, y 50 µg/ml	1.25, 2.5, 5, 10 y 25 µg/ml	50 µg/ml	20 µg/ml	15 µg/ml	5-16 hs
	Número de CMPs	200000-500000			500000		5000, 10000, 25000, 50000, 150000, 300000	
Condiciones Finales	Concentración de Antigeno	35 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	20 µg/ml	15 µg/ml	16 hs
	Número de CMPs	500000					50000	

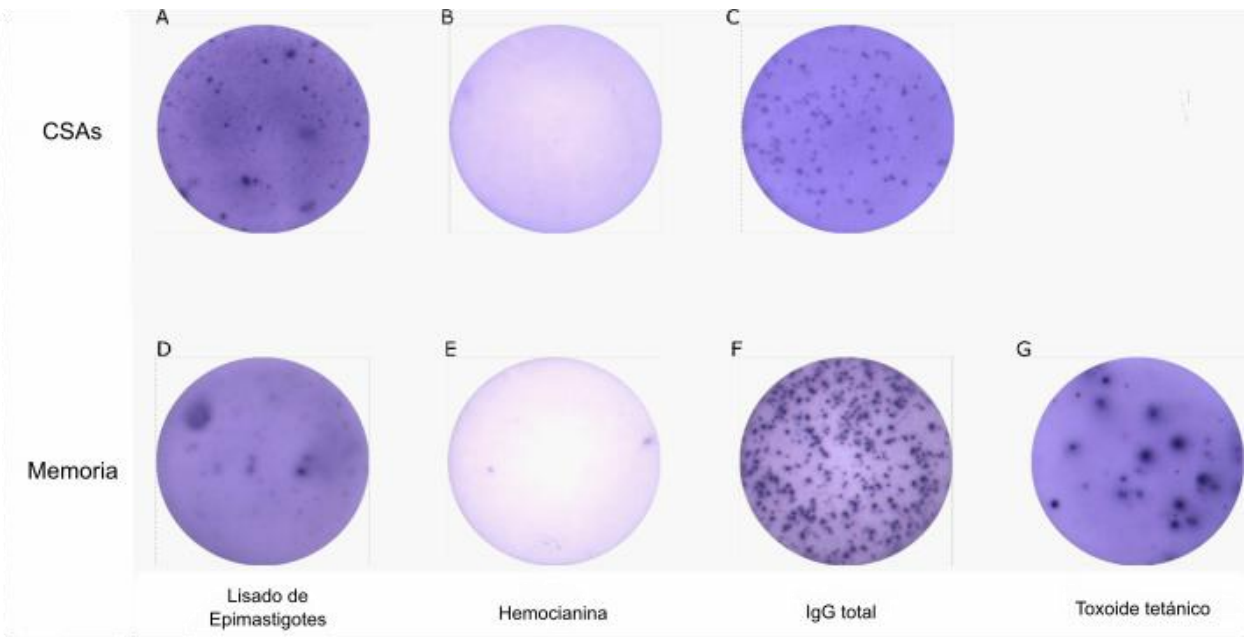

Figura 8. Lecturas representativas de ELISPOT para la cuantificación de células B específicas para *T. cruzi* en individuos con enfermedad de Chagas crónica. Utilizando las condiciones óptimas establecidas en la Tabla 4, se detectaron células secretoras de anticuerpos (CSAs) (A), y de memoria (D), en respuesta a un lisado derivado de *T. cruzi* Los pocillos recubiertos con hemocianina se utilizaron como control negativo (B y E) y la producción de IgG

total se utilizó como control positivo (C y F). Únicamente en el caso de la detección de células B de memoria, se utilizó toxoide tetánico como posible control positivo (G).

3.2 Preponderancia de CSAs en la circulación de pacientes con enfermedad de Chagas

Con las condiciones óptimas para la técnica de ELISPOT para células B establecidas en el apartado anterior, posteriormente cuantificamos CSAs y células B de memoria específicas para *T.cruzi* en CMPs de individuos adultos infectados con *T. cruzi* quienes no habían recibido tratamiento antiparasitario, y controles no infectados. A partir del valor de corte que establecimos a partir de los niveles de CSAs en personas no infectadas, 25 de 28 (89%) individuos infectados con *T.cruzi* que no recibieron tratamiento específico mostraron CSAs circulantes específicas para el lisado de *T. cruzi* utilizado también como antígeno en la técnica de ELISA “in-house" para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Figura 9 A y C). También observamos que 19 de 32 (59%) individuos infectados con *T. cruzi* presentaban CSAs específicas para proteínas recombinantes derivadas de *T. cruzi* o péptidos yuxtapuestos derivados de estas mismas proteínas (Figura 9 B y D). Para la detección de células B de memoria específicas de *T. cruzi,* se realizó previamente una estimulación policlonal con el fin de inducir su diferenciación a CSAs. Siete de 19 (37%) y 4 de 21 (19%) individuos infectados por *T. cruzi* tenían células B de memoria específicas para el lisado y para proteínas recombinantes derivadas de *T. cruzi* (Figura 10A), teniendo en cuenta el valor de corte establecido con los datos obtenidos de individuos no infectados (Figura 10B). No se observaron respuestas contra la proteína hemocianina, una proteína no relacionada utilizada como control negativo (Figura 9 A y C), mientras que la respuesta de memoria de las células B al toxoide tetánico, utilizado como control positivo, se detectó con más frecuencia en individuos no infectados que en individuos infectados con *T.cruzi* [es decir, en dos de nueve (22%) individuos infectados con *T. cruzi* (Figura 10A) y en 10 de los 11 (91%) individuos no infectados, (Figura 10B), P = 0,0045].

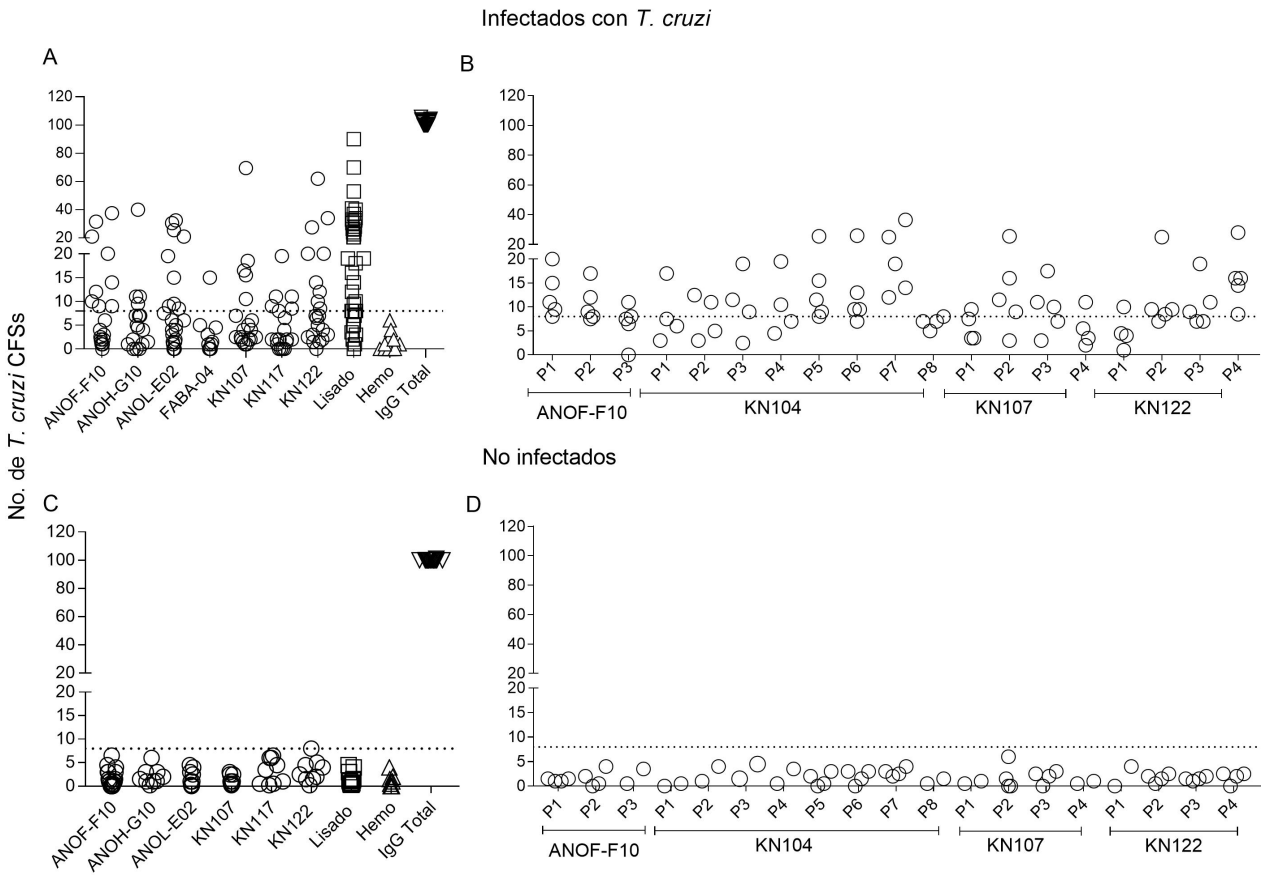

Figura 9. Número de CSAs periféricas específicas para *T. cruzi* en individuos con enfermedad de Chagas crónica. Cada símbolo representa el número de células secretoras de anticuerpos (CSAs) específicas para proteínas recombinantes de *T. cruzi*, un lisado derivado de epimastigotes y hemocianina (Hemo) [A y C] o grupos de péptidos yuxtapuestos (P) [B o D] en individuos con enfermedad de Chagas crónica (n = 32) y controles no infectados (n = 13). IgG total indica los niveles de CSAs totales del isotipo IgG. La línea de puntos representa el valor de corte para una respuesta positiva por la técnica de ELISPOT basada en el valor medio + 2 Desvíos Estándar de CSAs en individuos no infectados. CFSs, células formadoras de "spots".

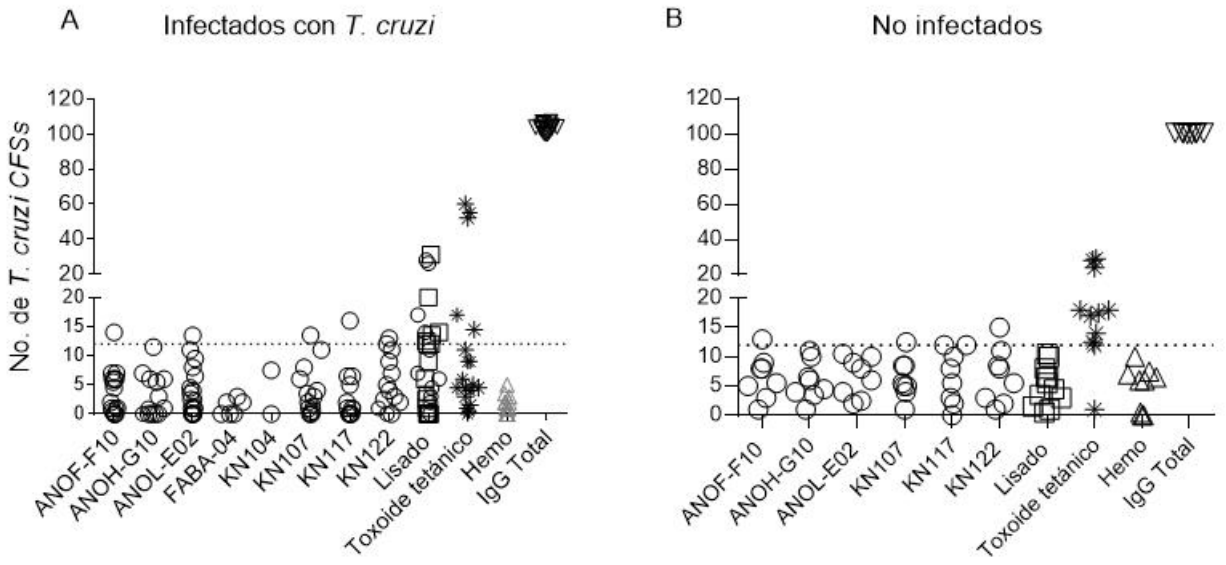

Figura 10. Número de células B de memoria periféricas específicas para *T. cruzi* en individuos con enfermedad de Chagas crónica. Cada símbolo representa el número de células B de memoria específicas para proteínas recombinantes de *T. cruzi*, un lisado derivado de epimastigotes, hemocianina (Hemo) o toxoide tetánico en individuos con enfermedad de Chagas crónica (n = 19) [A] y controles no infectados (n = 11) [B]. IgG total indica los niveles de células B de memoria totales del isotipo IgG. La línea de puntos representa el valor de corte para una respuesta positiva por la técnica de ELISPOT basada en el valor medio + 2 Desvíos Estándar de las células B de memoria en individuos no infectados. CFSs, células formadoras de "spots".

3.3 Fenotipo de las células B específicas para *T. cruzi*

Para cuantificar linfocitos B específicos para *T. cruzi* independientemente de su capacidad para secretar anticuerpos, utilizamos un método de doble tinción a partir de proteínas recombinantes de *T. cruzi* marcadas con dos fluorocromos a modo de "carnada" para la detección ex vivo de células B específicas de *T. cruzi* y de esa manera analizar su frecuencia y fenotipo (Loghman Salimzadeh, 2018). Estableciendo un valor de corte tomando la media + 2 desvíos standard de los valores obtenidos en personas no infectadas, se detectaron células B específicas para al menos una de las cuatro proteínas recombinantes de *T. cruzi* analizadas en 8 de los 11 (73%) individuos adultos infectados con *T.cruzi* evaluados, quienes no habían recibido tratamiento etiológico. Cabe destacar que no se observaron variaciones significativas entre los distintos grupos clínicos (Tabla 5). La combinación de las proteínas de *T. cruzi* marcadas con fluorocromos y anticuerpos específicos para marcadores fenotípicos de diferenciación y activación de células B (Figura 11 A) permitió determinar que las células B específicas para *T. cruzi* están integradas principalmente por células B *naïve*, de memoria en reposo, de memoria

atípica y en menor medida por plasmablastos, células B de centros germinales, células plasmáticas y células B de memoria activada (Figura 11 B-C). Cabe destacar que no se observaron variaciones significativas entre los distintos grupos clínicos, ni en frecuencia (Tabla 5) ni en el fenotipo de las subpoblaciones B (Figura 11 B-C).

Table 5. Frecuencia de células B específicas para *T. cruzi* utilizando proteínas recombinantes de *T. cruzi* marcadas con fluorocromos y analizadas por citometría de flujo.

ID del participante	Forma Clínica	Frecuencia de *células* $CD19^{+}CD10^{-}CD3^{-}$ B cells específicas para *T. cruzi*				No. de proteínas reactivas/ Total de proteínas evaluadas
		ANOL-E02	FABA	KN80	KN104	
PP425	G0	0.228	0.001	0.004	0.188	2/4
PP426		0.175	0.014	0.003	0.185	1/4
FC309		0.556	0.009	0.027	0.317	2/4
FC573		0.004	0,000	0.038	0.200	1/4
PP422		0.315	0.006	0.012	0.156	2/4
PP525		0.090	0.016	0.025	0.064	0/4
PP39	G1	0.294	0.001	0.009	0.0669	1/4
PP543		0.123	0.009	0.0002	0.0928	0/4
RD61	G2-G3	0.053	0.003	0.011	0.044	0/4
PP633		0.191	0.004	0.003	0.131	2/4
PP636		0.270	0.051	0.051	0.538	4/4
NI1	No infectados	0.059	0.000	0.003	0.084	0/4
NI2		0.110	0.000	0.017	0.005	0/4
NI3		0.140	0.000	0.000	0.010	0/4
NI4		0.148	0.019	0.015	0.074	0/4
Valor de corte[s]		*0.184*	*0.021*	*0.023*	*0.115*	

Nota. (El valor de corte se determinó como la media + 2 desvíos standard de los valores obtenidos de individuos no infectados y como requisito que las poblaciones contengan al menos 10 eventos en la lectura en el citómetro de flujo)

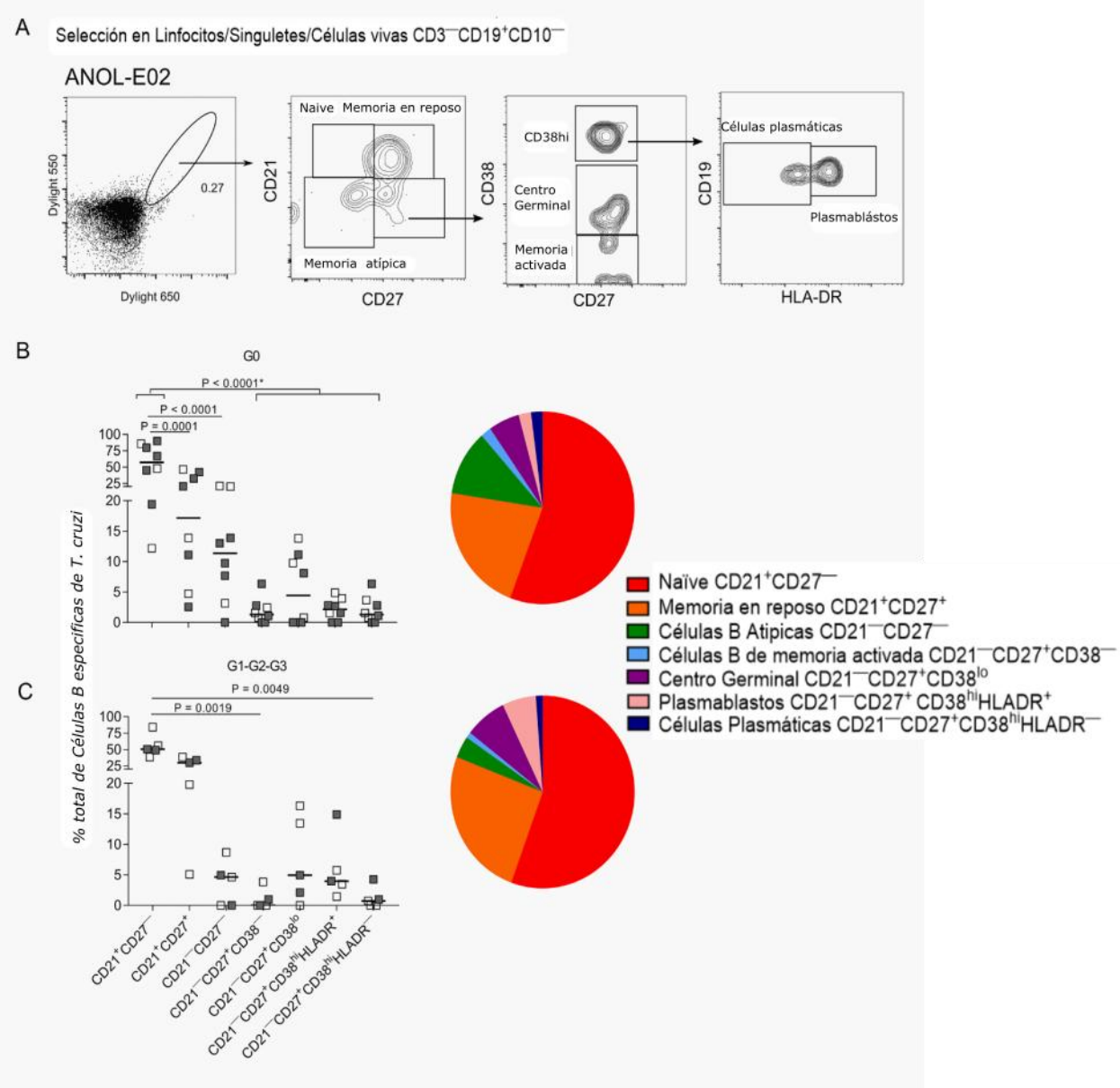

Figura 11. Fenotipo de las células B específicas para *T. cruzi* en diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas crónica. Las CMPs de individuos infectados con *T. cruzi* sin signos de enfermedad cardíaca (grupo G0) y con miocardiopatía (grupos clínicos G1, G2 y G3) se marcaron con anticuerpos monoclonales para E-Fluor Viability 780, CD3, CD10 y CD19 y con las proteínas de *T. cruzi* ANOL-E02 (símbolos blancos) y KN104 (símbolos negros) marcadas con DyLight 550 y DyLight 650 y analizadas mediante citometría de flujo. A continuación, se analizó la expresión de CD21, CD27, CD38 y HLA-DR en las células B que reconocen las proteínas de *T. cruzi* [A]. Los símbolos representan la proporción de cada subpoblación dentro del conjunto de células B ANOL-E02^{+} o KN104^{+} en individuos pertenecientes a los distintos grupos clínicos, G0 [B] o G1-G2-G3 [C]. Las tortas resumen los valores medianos de los datos en B y C. Para el análisis fenotípico se seleccionaron muestras con al menos 50 eventos. Los porcentajes de las poblaciones de células B se compararon mediante

una prueba de Kruskal-Wallis. * $P < 0.05$ entre $CD21^{+}CD27^{-}$ en comparación con cada una de las poblaciones de células B restantes.

3.4 Análisis compartimento total de células B

Dado que es sabido que en otras enfermedades crónicas existen alteraciones fenotípicas y funcionales de células B, realizamos un análisis fenotípico por citometría de flujo de las células B en circulación de individuos adultos y niños infectados por *T. cruzi* que no hubieran recibido tratamiento antiparasitario. La Figura 12 muestra en detalle la selección de paneles para la determinación de cada población. Los pacientes adultos presentaban niveles aumentados de células B *naïve* activadas, plasmablastos y memoria atípica y una disminución en las células B de memoria en reposo (Figura 13A) en comparación con las personas no infectadas. Aunque no es estadísticamente significativo, se observó también un aumento en las células B *naïve* (Figura 13A).

En la población de niños infectados con *T. cruzi* se observó un aumento en los niveles de células B *naïve* activadas, plasmablastos y de memoria atípicas en comparación con los niños no infectados (Figura 13B). Aunque no se alcanzó significancia estadística, los niños infectados presentaban una disminución en el nivel de las células B de memoria en reposo (Figura 13B).

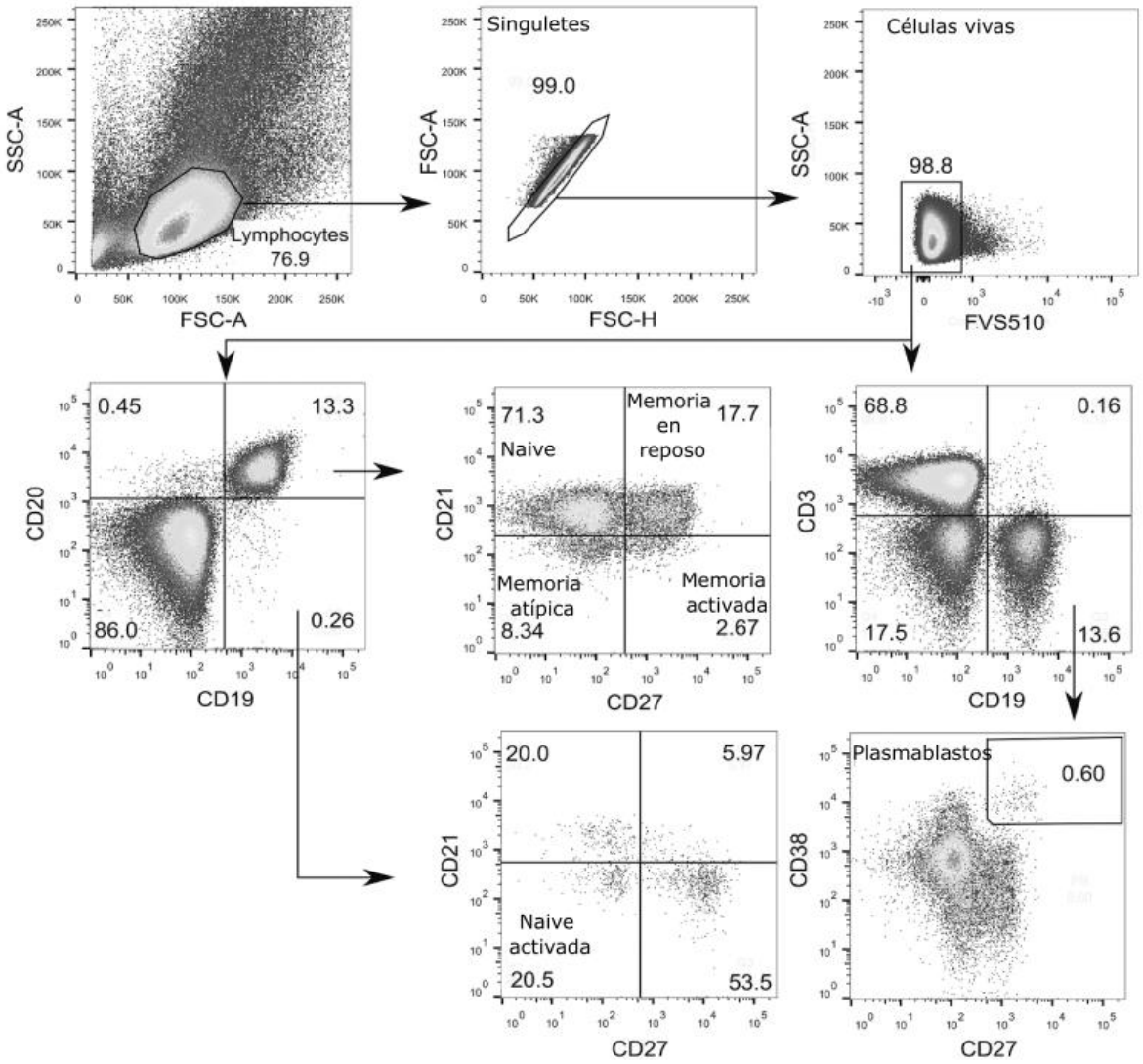

Figura 12. **Selección de poblaciones fenotípicas de linfocitos B.** Las CMPs se tiñeron utilizando el marcador de viabilidad FVS510 y los anticuerpos anti CD3, CD19, CD20, CD21, CD27, CD38 y se analizaron mediante citometría de flujo. Los linfocitos se seleccionaron en función de los parámetros de dispersión frontal y dispersión lateral y a continuación se utilizó el forward-scatter area vs. forward-scatter height para la discriminación de dobletes. Los análisis posteriores se realizaron en células viables (FVS510^{-}). Los números en cada diagrama indican la proporción de la población seleccionada.

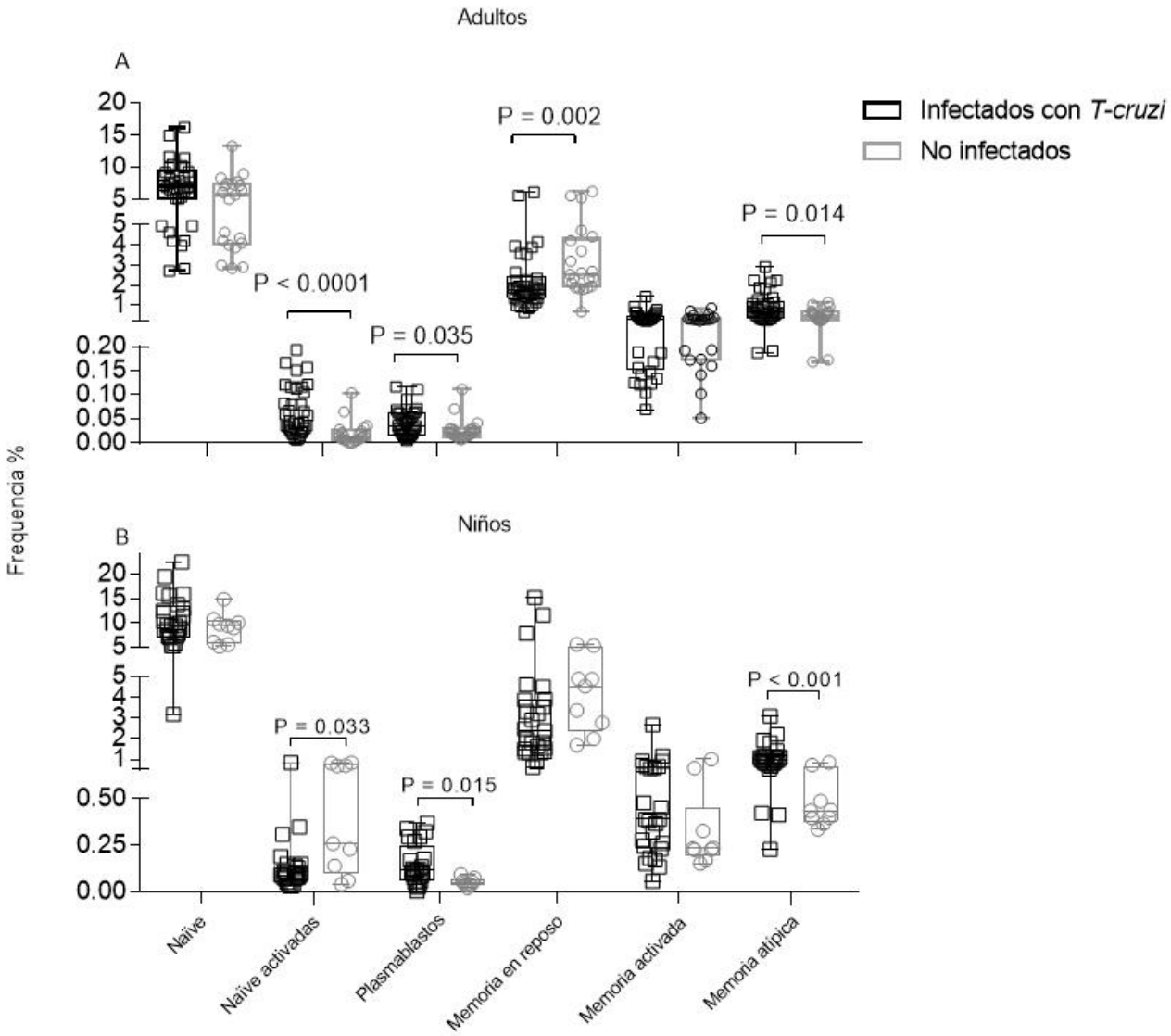

Figura 13. **Perfil fenotípico de linfocitos B totales en adultos y niños infectados con *T. cruzi*.** Las CMPs se tiñeron con una combinación del marcador de viabilidad E-Fluor Viability 780 y anticuerpos monoclonales anti CD3, CD20, CD19, CD21, CD27 y se analizaron mediante citometría de flujo. Los linfocitos se seleccionaron en función de los parámetros de dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC). Se seleccionaron sobre células vivas las poblaciones $CD3^{-}CD19^{+}$, *naïve* en reposo ($CD20^{+}CD21^{+}CD27^{-}$), *naïve* activadas ($CD20^{-}CD21^{-}CD27^{-}$), plasmablastos ($CD38^{hi}CD27^{-}$), memoria en reposo ($CD20^{+}CD21^{+}CD27^{+}$), memoria activada ($CD20^{+}CD21^{-}CD27^{+}$) y memoria atípica ($CD20^{+}CD21^{-}CD27^{-}$). Las barras indican la mediana y el rango intercuartilo 10-90 de los porcentajes de células B relativizadas según el porcentaje individual de células $CD19^{+}$ en adultos infectados con *T. cruzi* (n = 27) y no infectados (n = 10) [A] y niños infectados con *T. cruzi* (n = 24) y no infectados (n = 9) [B].

3.5 Análisis de la producción de citocinas y polifuncionalidad de las diferentes subpoblaciones de células B en la circulación de individuos con enfermedad de Chagas crónica

Las citocinas producidas por las células B son importantes para la regulación de la respuesta inmune (Allie SR, 2020) por lo que se analizó la producción de citocinas por las diferentes subpoblaciones B mediante citometría de flujo. Al estimular las CMPs se observó un aumento significativo en la producción de IL-6 por las células B en todas las formas clínicas de los de la enfermedad de Chagas crónica así como también en los individuos no infectados (Figura 14A). Al analizar la relación de la producción de IL-6 entre muestras estimuladas versus muestras no estimuladas se observó un mayor incremento en la producción de esta citocina en el grupo clínico G0 comparándolo con los controles no infectados y con las formas clínicas más avanzados de los grupos G2 y G3. De manera similar, se observó un aumento en la producción de TNF-α luego de la estimulación policlonal en todas las formas clínicas (Figura 14B). Del análisis del cociente de la producción de TNF-α entre la muestra estimulada/no estimulada se observó una mayor producción en el grupo G0 comparado con las formas clínicas más avanzados (Figura 14B). Sólo dos pacientes del grupo G2-G3 presentaron un alto nivel de respuesta. Por el contrario, no se observaron cambios en la producción de IL-10 ante la estimulación policlonal para ninguna de las formas clínicas (Figura 14C).

Posteriormente nos propusimos analizar el fenotipo de células productoras de IL-6 y TNF-α (Figura 15A). Las células B *naïve* activadas y de memoria fueron las principales poblaciones productoras de TNF-α (Figura 15B) e IL-6 (Figura 15C) en individuos no infectados. En los pacientes con enfermedad de Chagas crónica, la producción de TNF-α e IL-6 por parte de las células B de memoria que expresan HLADR disminuye mientras que la producción por parte de las células B *naïve* activadas aumenta a medida que aumenta el compromiso cardíaco. Es importante aclarar que el fenotipo que llamamos "células B de memoria $HLADR^{+}$" presenta marcadores los $CD27^{+}CD21^{+}HLADR^{+}$ por lo que interpretamos que, al expresar $HLADR^{+}$, podría tratarse de una forma intermedia previo al pasaje hacia un fenotipo de memoria activada en el que se pierde la expresión de CD21. La contribución de las células B de memoria atípica en la producción de estas citocinas fue baja tanto en individuos no infectados como en individuos infectados por *T. cruzi* (Figura 15B y 15C). A pesar de tratarse de bajos niveles, los pacientes de la forma clínica G0 presentaron mayores niveles de células de memoria activada/plasmablastos comparado con los de formas clínicas más avanzados (Figura 15C). Es importante aclarar que somos incapaces de diferenciar correctamente la población "Memoria Activada/plasmablastos" porque en este caso ambas presentan la expresión de los marcadores $CD21^{-}CD27^{+}HLADR^{+}$.

Algo similar ocurre para el grupo que llamamos “potenciales células plasmáticas”, dado que nos faltarían marcadores para delimitar con exactitud el fenotipo, pero que igualmente se observan en muy baja proporción entre los linfocitos B productores de TNF-α o IL-6, como es de esperarse por su baja frecuencia en circulación

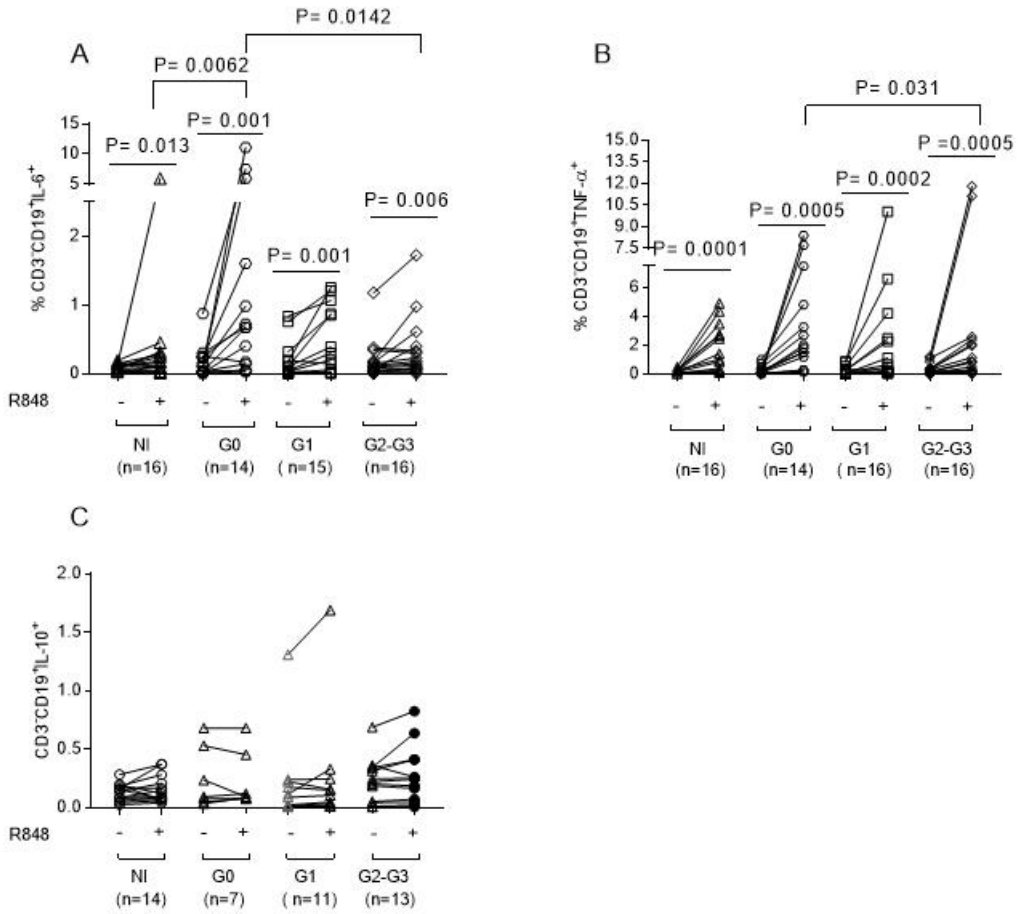

Figura 14. **Función de las células B en la fase crónica de la infección con *T. cruzi*.** Usando el activador policlonal R848 se estimularon CMPs de controles no infectados (NI), individuos seropositivos para *T. cruzi* sin signos de enfermedad cardíaca (grupo G0), individuos con enfermedad cardíaca leve (es decir, G1) e individuos con miocardiopatía grave (grupos G2-G3) durante 16-20 h, y la producción de citocinas se midió mediante tinción intracelular usando citometría de flujo. Cada punto representa la frecuencia de las células B $CD19^{+}IL\text{-}6^{+}$ [A] o $CD19^{+}TNF\text{-}\alpha^{+}$ [B] o $IL\text{-}10^{+}$ [C]. Los valores de citocinas provenientes de cultivos celulares estimulados y no estimulados se compararon utilizando una prueba de Wilcoxon pareada. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar el cociente de los valores de citocinas provenientes de muestras estimuladas/no estimuladas entre los grupos clínicos.

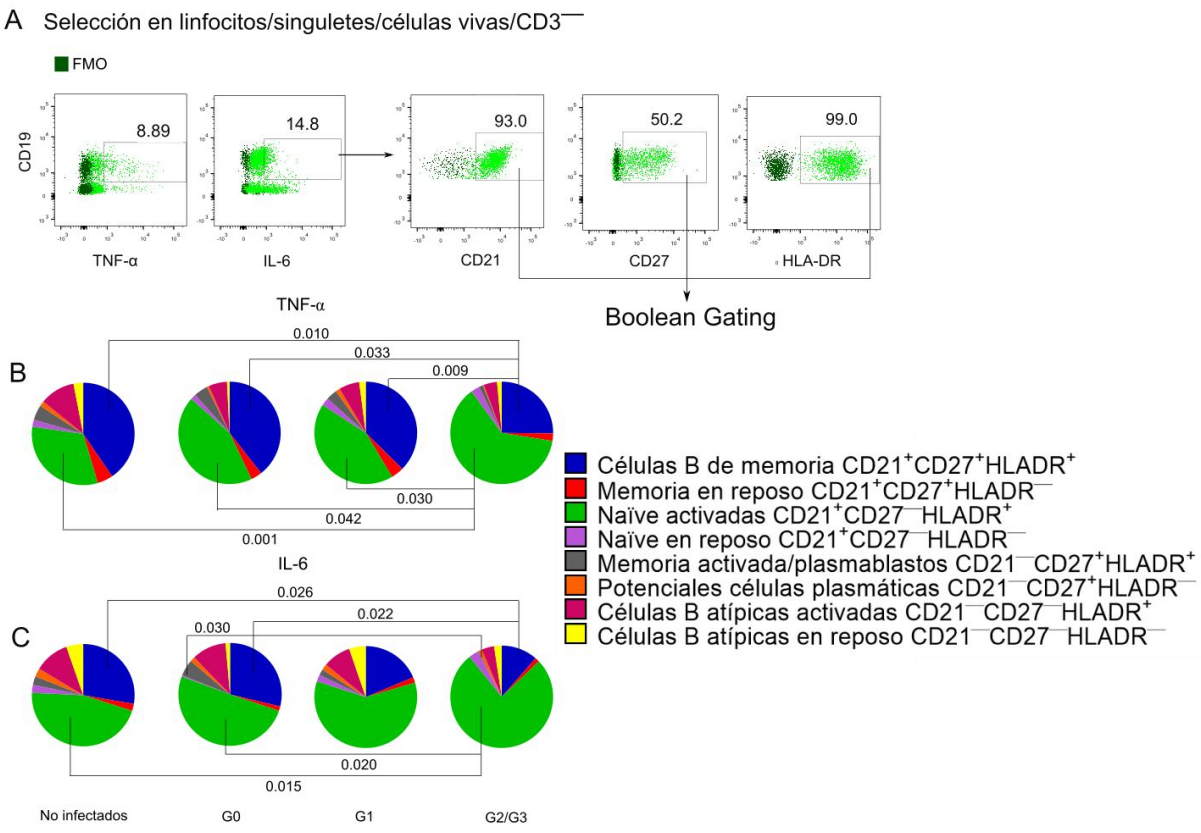

Figura 15. Caracterización fenotípica de células las productoras de IL-6 y TNF-α en pacientes con enfermedad de Chagas crónica en diferentes formas clínicas. Se analizaron las células B productoras de TNF-α e IL-6 en respuesta a R848 para determinar la expresión de CD21, CD27 y HLA-DR en muestras de CMPs de individuos con enfermedad de Chagas crónica e individuos no infectados utilizando la herramienta de selección booleana del software FlowJo [A]. Cada porción de los gráficos de tortas representa los valores medios de cada fenotipo en células B productoras de TNF-α [B; individuos no infectados, n = 8; grupo G0, n = 10; G1, n = 8 y grupo G2/G3, n = 8] y células B productoras de IL-6 [C; individuos no infectados, n = 3; grupo G0, n = 8; grupo G1, n = 3; grupo G2/G3, n = 3]. * $P \leq 0{,}05$; ** $P \leq 0.01$ en comparación con individuos no infectados analizados por ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Conclusiones parciales I

- La mayoría de los individuos con infección crónica con *T. cruzi* presentaron niveles detectables de CSAs mientras que una menor proporción mostró células B de memoria en la circulación.

- El uso de un lisado derivado de la cepa Tulahuén, que también se utiliza en el ELISA para el diagnóstico de la patología, fue el antígeno que presentó mayor sensibilidad para detectar CSAs específicas para *T. cruzi*.

- La utilización de proteínas recombinantes de *T. cruzi* marcadas con fluorocromos permitieron la cuantificación de células B específicas para *T. cruzi* independientemente de su capacidad para secretar anticuerpos, no observándose diferencias entre los distintos grupos clínicos.

- Dado que se detectan células B de memoria clásicas específicas para el parásito, es probable que exista una subestimación en la detección por el ELISPOT.

- Existe una disfunción en la producción de citocinas inflamatorias en los pacientes con miocardiopatía más avanzadas con producción preponderante por parte de linfocitos B *naïve* activados y células B de memoria preactivación, $CD27^{+}CD21^{+}HLADR^{+}$

3.6 Desaparición de las CSAs específicas para *T. cruzi* de la circulación de pacientes con reducción en los títulos de anticuerpos específicos después del tratamiento con benznidazol

Dado que los plasmablastos son células productoras de anticuerpos de vida corta que se renuevan constantemente en la circulación durante una infección activa (Moir 2013, Fink 2012), nos planteamos determinar si el tratamiento exitoso con benznidazol podría dar como resultado la eliminación de los plasmablastos específicos para *T. cruzi* de la circulación de los pacientes que responden al tratamiento etiológico. Para cada paciente se determinó la respuesta al tratamiento evaluando la disminución de los títulos serológicos medido por serología convencional, y a través del ensayo de multiplex, considerando exitoso el tratamiento que cumplía el criterio explicado en el apartado "Selección de la población de estudio" de la sección de Materiales y Métodos, y no exitoso a aquel tratamiento que no reunía los criterios establecidos. De los 17 pacientes adultos que respondieron al tratamiento parasiticida (de un total de 37 que recibieron tratamiento parasiticida, Tabla 1), dos presentaron descensos de títulos de anticuerpos específicos para *T. cruzi* sólo por serología convencional, cinco por serología convencional y multiplex y 10 de ellos sólo por la técnica de multiplex solamente. De los 18 pacientes pediátricos que respondieron al tratamiento (de un total de 25 niños tratados), tres mostraron descensos de títulos anti *T. cruzi* sólo por serología convencional, 11 por serología convencional y multiplex y en 4 de ellos no se realizó el ensayo de multiplex pero presentaron descensos de títulos por serología convencional.

Utilizando la técnica de ELISPOT para la detección de células B, observamos que las CSAs que reconocen antígenos de *T. cruzi* disminuyen significativamente a los 12 meses postratamiento con benznidazol comparado con el tiempo previo al tratamiento (tiempo 0) y llega a valores por debajo del valor de corte al final del seguimiento en todos los pacientes adultos con enfermedad de Chagas (Figura 16A) que mostraron una disminución significativa en los niveles de anticuerpos específicos para *T. cruzi*, ya sea mediante pruebas serológicas convencionales o ensayos de múltiplex, como se detalló en Materiales y Métodos. La mediana de disminución de las CSAs en al menos el 50% de su valor fue de 24 meses postratamiento (rango de 6-85 meses), y la mediana de eliminación de las mismas fue de 60 meses (rango de 1-9 años) (Figura 16A). En cambio, la mayoría de los pacientes con títulos serológicos estables (considerados como no respondedores) durante el seguimiento postratamiento, presentaban valores de CSAs por debajo del valor de corte antes de comenzar el tratamiento y no variaron durante el seguimiento (Figura 16B). Los pocos pacientes de este grupo que tenían valores detectables de CSAs pretratamiento mostraron niveles estables de estas células, con excepción de un paciente que mostró un descenso de más del 50% en los niveles de CSAs a los 36 meses

postratamiento pero no se alcanzó el valor de corte (Figura 16B). Sin embargo, no se disponía de más muestras a tiempos posteriores como para evaluar la evolución serológica a mayor tiempo de seguimiento. La eliminación de CSAs en niños infectados con *T. cruzi* fue más rápida que la observada en pacientes adultos (Figura 16E), con una mediana de eliminación de 24 meses (rango 24-36 meses). Dado que la mayoría de los individuos adultos y niños infectados con *T. cruzi* evaluados en este estudio no alcanzaron la negativización completa de la serología convencional, evaluamos en forma transversal un grupo adicional de pacientes adultos y niños que habían negativizado los títulos serológicos en al menos 2 de las 3 técnicas observando en todos ellos valores de CSAs por debajo del valor de corte (Figura 16A y 16E).

Con respecto a las células B de memoria específicas para *T. cruzi,* los niveles eran generalmente bajas antes del tratamiento en adultos (Figura 16C y 16D) y niños (Figura 16F) y no aumentaron significativamente después del tratamiento independientemente de la evolución serológica. Seis de 23 pacientes adultos (Figura 16C y 16D) tenían niveles de las células B de memoria por encima del valor de corte antes de empezar la terapia y sólo dos de ellos permanecieron con niveles positivos de CSAs después del tratamiento. Uno de los cuatro niños en los que se evaluaron los niveles de linfocitos B de memoria específicos para *T. cruzi* (Figura 16E) mostraba niveles de estas células por encima del valor de corte antes del tratamiento, pero ninguno de ellos después del tratamiento. Cabe destacar que el número de pacientes que presentaban valores de CSAs mayores al valor de corte antes de comenzar el tratamiento, fue mayor en el grupo de pacientes con evolución serológica favorable postratamiento (Figura 16A) que en el grupo que mostró títulos serológicos estables luego del tratamiento con benznidazol (Figura 16B) [14 de 17 vs. 4/10, respectivamente, P = 0.028].

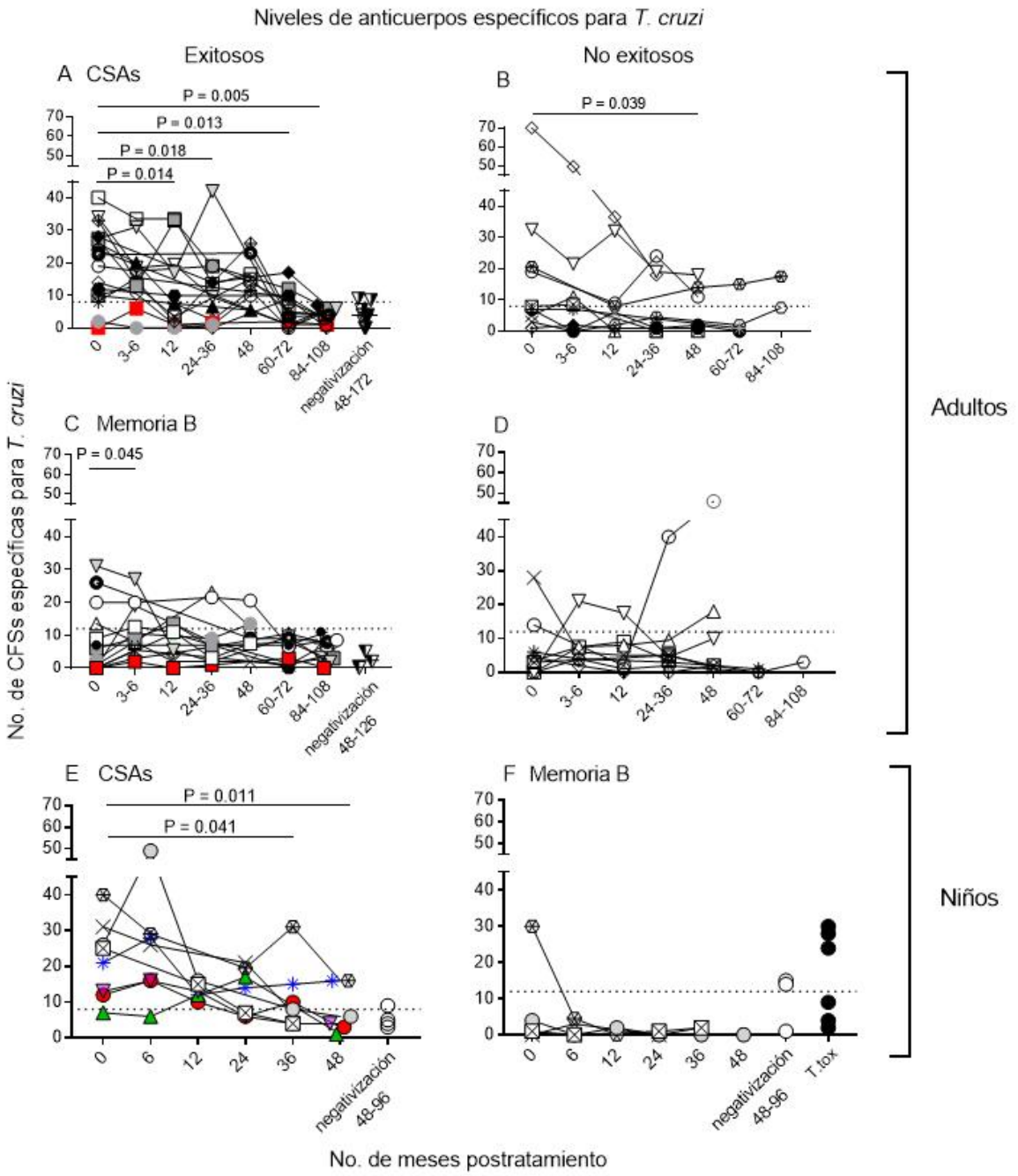

Figura 16. **Frecuencia de CSAs específicas para *T. cruzi* y linfocitos B de memoria en individuos con enfermedad de Chagas crónica tratados con benznidazol o nifurtimox**. Cada símbolo representa las células secretoras de anticuerpos (CSAs) o células B de memoria que reconocen al lisado de epimastigotes, provenientes de pacientes infectados con *T. cruzi* que mostraron una disminución en los niveles de anticuerpos específicos para *T. cruzi* (n = 17) [A y C] o cuyos niveles se mantenían estables (n = 10) [B y D] después del tratamiento con benznidazol. Los niños fueron tratados con benznidazol o nifurtimox (n = 8) [E y F] y todos excepto uno (representado con un asterisco azul), mostraron una disminución en los títulos de anticuerpos específicos para *T. cruzi* después de la terapia. La línea de puntos indica el valor de corte basado en los valores obtenidos de individuos no infectados, como se indica en Materiales

y Métodos. Los cambios respecto al valor previo al tratamiento (tiempo 0) se evaluaron utilizando un modelo lineal mixto para medidas repetidas. Los símbolos en verde y en rojo representan individuos con negativización en dos o tres de las técnicas serológicas convencionales durante el seguimiento posterior al tratamiento. Se tomaron muestras de 9 individuos adultos y de 4 niños con al menos 5 años de seguimiento postratamiento y que negativizaron la serología convencional; *T. tox*, reconocimiento de las células B de memoria al toxoide tetánico (n = 6).

3.7 Correlación entre los cambios en los niveles de CSAs y los títulos serológicos

Realizando una comparación entre las diferentes técnicas serológicas convencionales mediante las cuales se realiza el diagnóstico y seguimiento de los individuos tratados observamos el contraste en los valores serológicos de los pacientes que presentan una evolución positiva o exitosa versus los que no presentan cambios en los títulos a lo largo del seguimiento postratamiento, tanto para adultos (Figura 17) como para niños (Figura 18). En los pacientes con evolución serológica favorable, (determinada no sólo a través de la serología convencional, sino también a través de la técnica de multiplex), se observó que la disminución en los niveles de CSAs se correlacionaba muy bien con la disminución en los títulos de anticuerpos específicos para *T. cruzi* utilizando la técnica de multiplex y precedía a la disminución de los niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi* medido por serología convencional (Figura 19). También observamos que al final del tratamiento, aproximadamente el 80% de los pacientes tratados presentaban una evolución serológica favorable cuando se evalúa basado en los cambios en los niveles de CSAs o de anticuerpos por la técnica de multiplex (Figura 19). En cambio, tomando sólo la técnica de ELISA o la combinación de las tres técnicas serológicas convencionales se estimó como respuesta exitosa al tratamiento en un 53% y 59% de los pacientes, respectivamente.

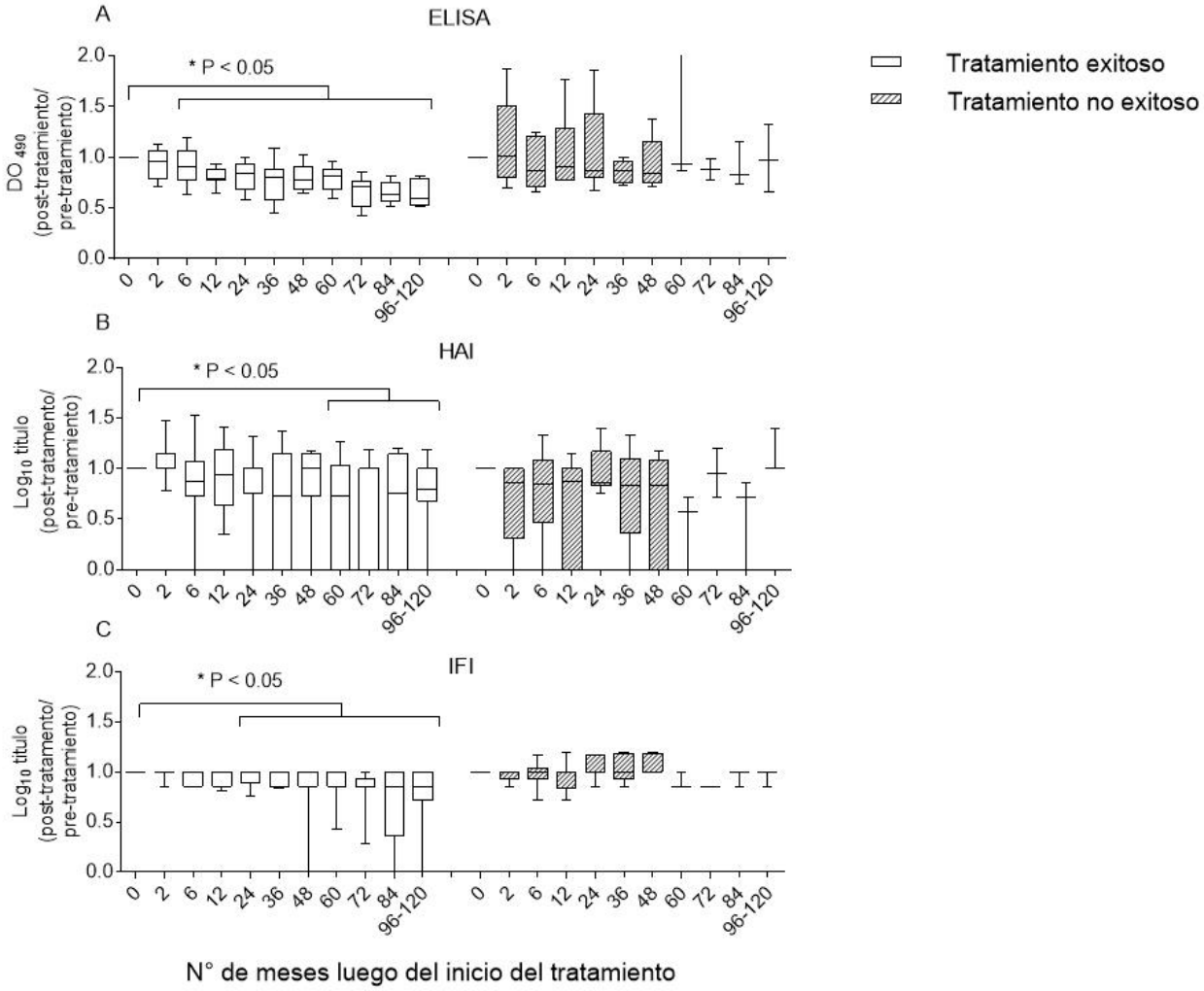

Figura 17. **Monitoreo postratamiento de los niveles de anticuerpos específicos para *T. cruzi* usando técnicas serológicas convencionales en pacientes adultos tratados con beznidazol.** Evolución de la respuesta humoral específica para *T. cruzi* por serología convencional en individuos con infección crónica por *T. cruzi*, tratados con benznidazol que se clasificaron según el criterio de éxito de tratamiento. Valores de ELISA (A), HAI (B), IFI (C), antes y después del tratamiento. Las columnas blancas representan a los niños que alcanzaron el criterio de éxito terapéutico según se detalló en materiales y métodos (grupo exitoso); y las columnas rayadas representan a los individuos que no alcanzaron dicho criterio (grupo no exitoso). *Valores significativos entre el tiempo pretratamiento (tiempo 0) con cada uno de los tiempos postratamiento indicados con el corchete. Los datos se muestran como cajas con interquartiles 10-90.

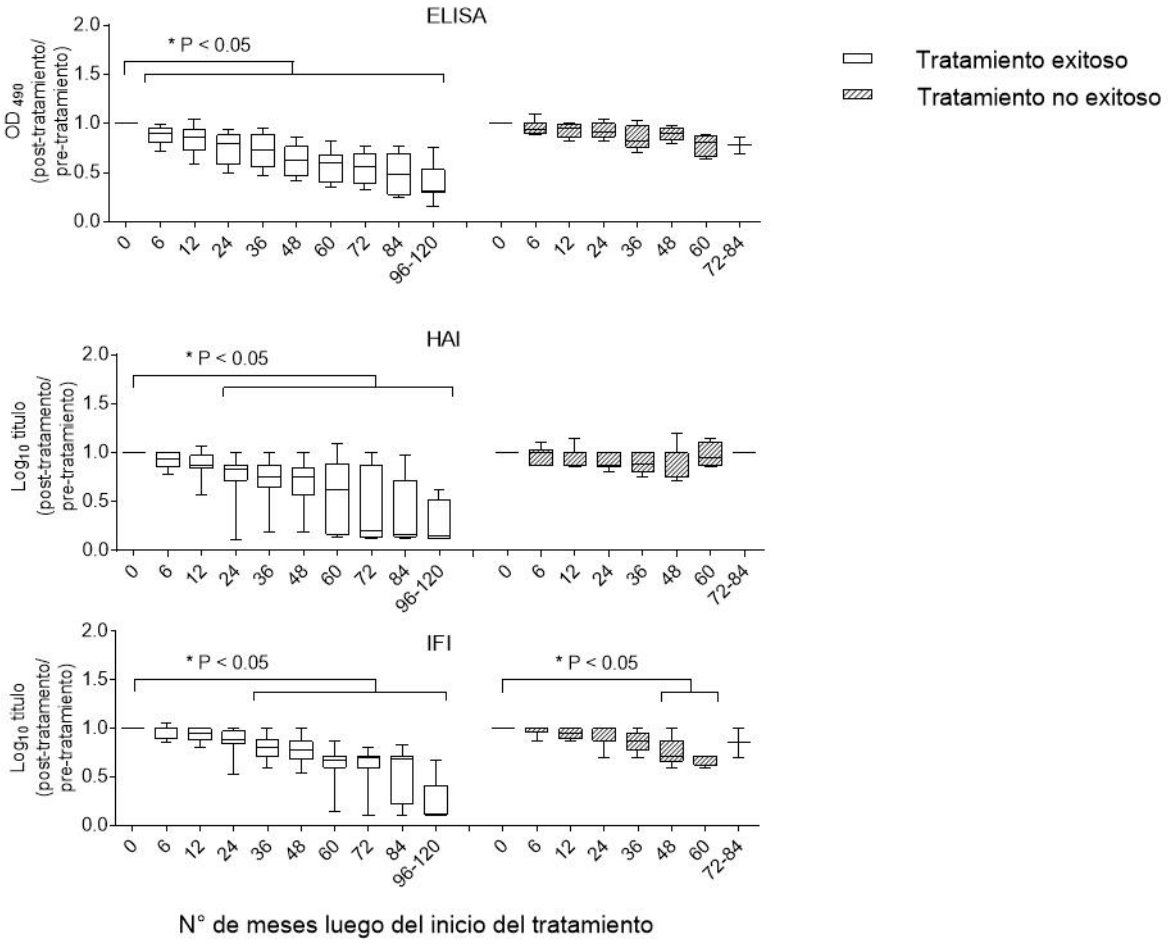

Figura 18. **Monitoreo postratamiento de los niveles de anticuerpos específicos para *T. cruzi* usando técnicas serológicas convencionales en pacientes pediátricos tratados con beznidazol.** Evolución de la respuesta humoral específica para *T. cruzi* por serología convencional en niños con infección crónica por *T.cruzi*, tratados con benznidazol que se clasificaron según el criterio de éxito de tratamiento. Valores de ELISA (A), HAI (B), IFI (C), antes y después del tratamiento. Las columnas blancas representan a los niños que alcanzaron el criterio de éxito terapéutico según se detalló en materiales y métodos (grupo exitoso); y las columnas rayadas representan a los niños que no alcanzaron dicho criterio (grupo no exitoso). *Valores significativos entre el tiempo pretratamiento (tiempo 0) con cada uno de los tiempos postratamiento indicados con el corchete. Los datos se muestran como cajas con interquartiles 10-90.

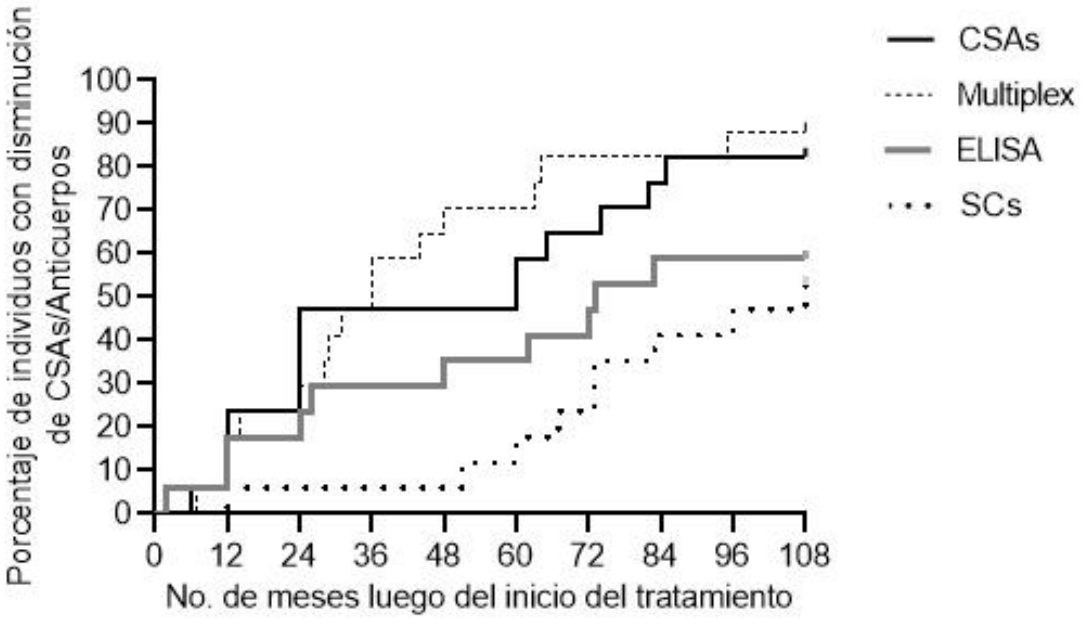

Figura 19. Monitoreo de CSAs y anticuerpos específicos para *T. cruzi* después de la administración de benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Antes de iniciar el tratamiento con benznidazol y a diferentes tiempos postratamiento se midieron células secretoras de anticuerpos (CSAs) utilizando la técnica ELISPOT y los anticuerpos específicos para *T. cruzi* mediante los ensayos serológicos convencionales (SCs), ELISA, hemaglutinación e inmunofluorescencia indirecta y mediante el ensayo de multiplex. La respuesta del tratamiento se consideró exitosa cuando se observó una disminución significativa en los títulos de anticuerpos en al menos 2 de 3 técnicas serológicas convencionales o una disminución del 50% en la reactividad hacia al menos dos proteínas recombinantes en el ensayo de multiplex (ver Materiales y Métodos). El gráfico muestra el porcentaje acumulativo de los pacientes que alcanzaron el criterio de respuesta exitosa medida por las distintas técnicas. P = 0,035 entre las curvas que representan CSAs y ELISA; P = 0,017 entre las curvas que representan CSAs y disminución en 2/3 o 3/3 SCss; y P = 0,040 entre las curvas que representan CSAs y ELISA, calculado mediante la prueba de rango logarítmico (Mantel-Cox).

Para confirmar estos resultados, utilizamos la metodología de los antígenos marcados con los dos fluorocromos para evaluar si los niveles de CSAs específicas para las proteínas recombinantes derivadas de *T. cruzi* incluidas en el ensayo de multiplex cambiaban en paralelo con los niveles de anticuerpos específicos para estas proteínas. La Figura 20 muestra los datos de un paciente con respuesta exitosa al tratamiento con benznidazol, donde se observa una correlación entre la disminución de CSAs que reconocen las proteínas FABA4 y ANO-LE2 por

ELISPOT y por la técnica de proteínas marcadas por citometría de flujo, y la disminución de la reactividad del suero hacia estas mismas proteínas usando el ensayo de multiplex. Estos cambios se asociaron también a la negativización de las técnicas ELISA, HAI e IFI.

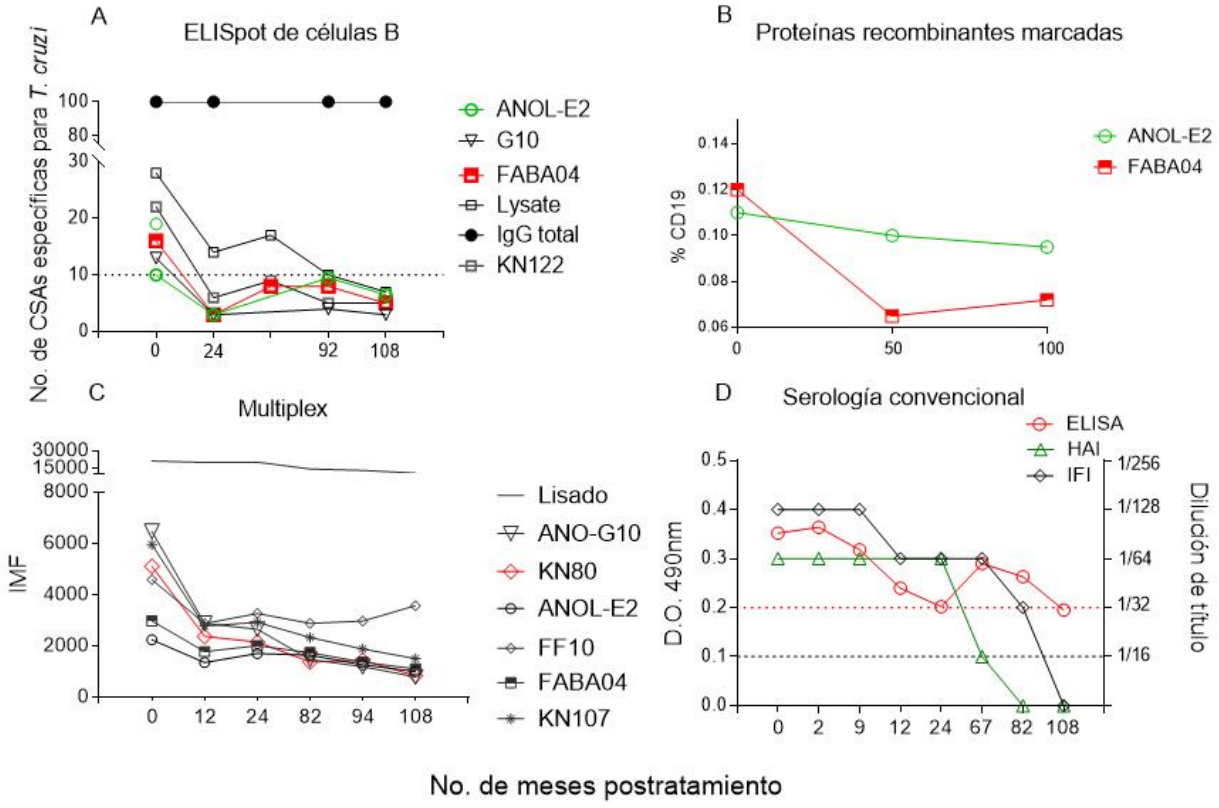

Figura 20. **Correlación entre los valores de seroconversión, multiplex y el monitoreo de CSAs en la respuesta al tratamiento con benznidazol**. Los distintos paneles muestran los cambios en los niveles de células secretoras de anticuerpos (CSAs) por ELISPOT (A) o mediante citometría de flujo con proteínas derivadas de *T. cruzi* marcadas con fluorocromos (B) y en los niveles de anticuerpos medidos por el ensayo de multiplex (C) o serología convencional (D) de un paciente con respuesta exitosa al tratamiento con benznidazol. Las líneas punteadas en (A) indican el valor de corte para las CSAs. Las líneas punteadas en rojo en (D) indican el valor de corte para las técnicas de ELISA, y las líneas punteadas en negro indican el valor de corte para las técnicas de HAI e IFI.

Conclusiones parciales II

- Las CSAs son eliminadas de la circulación en aquellos individuos que lograron una reducción de los títulos serológicos después del tratamiento.

- Mientras que la reducción en los niveles de CSAs es relativamente temprana a los 12 meses postratamiento, la eliminación se logra a tiempos prolongados luego de la terapia tripanocida.

- La disminución en el número de CSAs fue predictor del éxito alcanzado luego del tratamiento antiparasitario y su caída es concomitante con la reducción de los niveles de anticuerpos específicos para *T. cruzi* medido por el ensayo de multiplex.

3.8 Evaluación del fenotipo total de células B después del tratamiento en adultos y niños

Posteriormente nos propusimos evaluar si el tratamiento con benznidazol restablecía un fenotipo similar al del grupo no infectado. El tratamiento con benznidazol indujo una disminución en las frecuencias de células B *naïve* activada (Figura 21D), memoria activada (Figura 21G) y memoria atípica (Figura 21J) a niveles comparables al grupo no infectado en los pacientes que mostraron un descenso significativo de los títulos serológicos hacia *T. cruzi*. Si bien se observa una tendencia hacia valores más bajos de células B de memoria activada (Figura 21H) y de memoria atípica (Figura 21K) en los pacientes que no mostraron descensos significativos en los títulos de anticuerpos hacia *T. cruzi* postramiento, estos cambios no llegaron a ser significativos en el seguimiento. Las células B *naïve* en ambos grupos (Figura 21A y 21B), disminuyeron pos tratamiento, pero se revirtió hacia el final del seguimiento. Cabe destacar, que los niveles de células *naïve* activadas (Figura 21E) en los pacientes que no mostraron una evolución serológica favorable era más bajo antes de iniciar el tratamiento (es decir el tiempo denominado 0) comparado con el tiempo pretratamiento del grupo (Figura 21D) que posteriormente respondió favorablemente al tratamiento con benznidazol. Estos bajos valores no se alteraron durante el seguimiento. El seguimiento de pacientes no tratados no mostró cambios significativos en las poblaciones de células B evaluadas (Figura 21C, 21F, 21I y 21L)

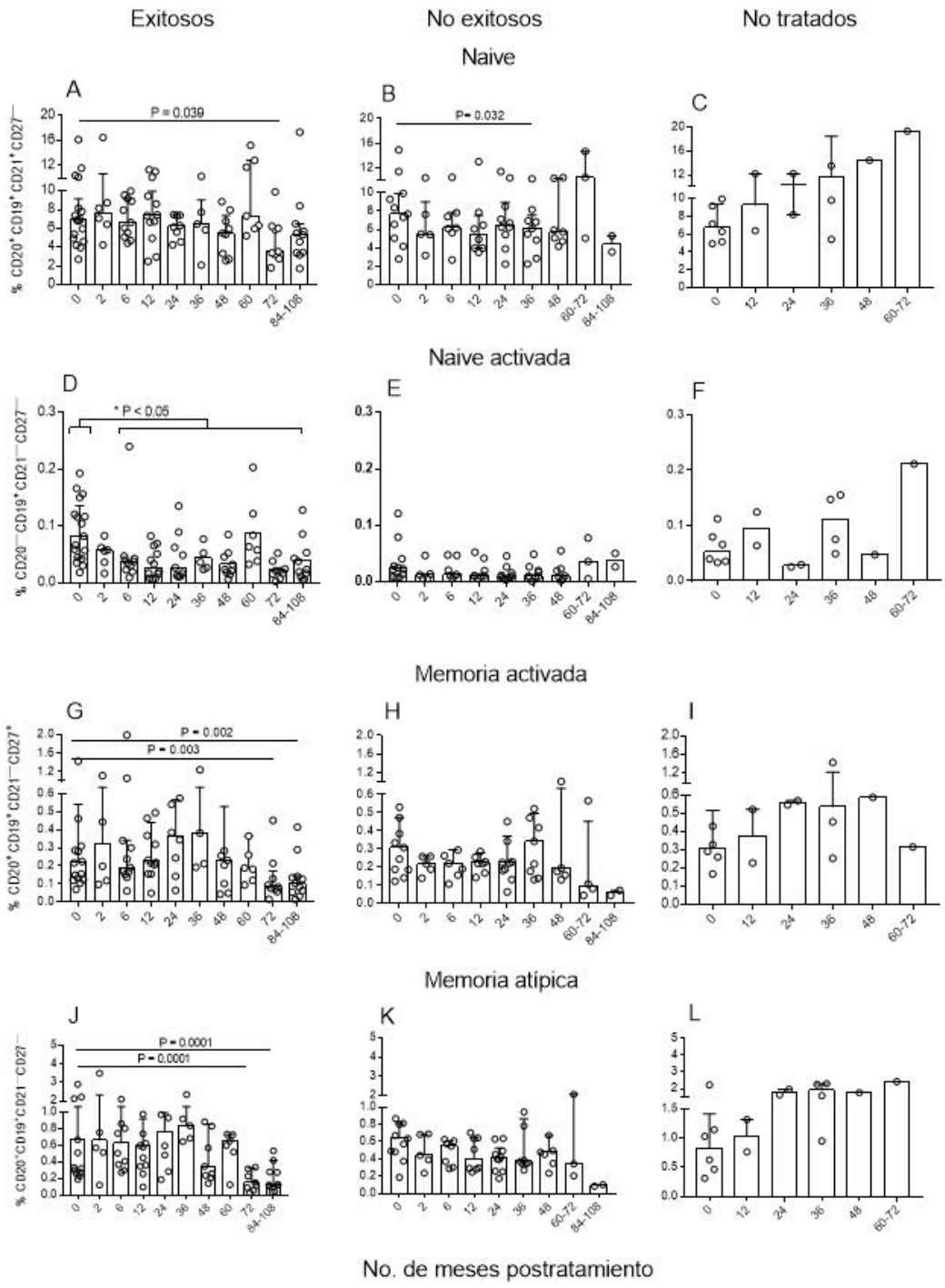

Figura 21. **Perfil fenotípico de linfocitos B totales en individuos adultos infectados con *T. cruzi* antes y después del tratamiento con benznidazol.** Las CMPs se tiñeron con una combinación del marcador de viabilidad E-Fluor Viability 780 y anticuerpos monoclonales CD3, CD20, CD19, CD21 y CD27 y se analizaron mediante citometría de flujo. Las barras indican la mediana y el rango interquartilo 10-90 de la frecuencia de células B que expresan un fenotipo particular pretratamiento (0) y a distintos tiempos postratamiento en pacientes con evolución serológica favorable después de la administración de benznidazol [A, D, G y J; n = 15] o individuos cuyos títulos de anticuerpos hacia *T. cruzi* no se alteraron [B, E, H y K; n = 6]. Los

individuos infectados por *T. cruzi* no tratados (n = 6) bajo seguimiento se representan en [C, F, I y L]. Los valores se relativizaron según el porcentaje individual de células B $CD19^{+}$.

En la población de niños infectados que recibieron el tratamiento antiparasitario, los niveles de plasmablastos (Figura 22A) disminuyeron y los niveles de memoria en reposo (Figura 22C) aumentaron en los niños que lograron una respuesta serológica exitosa al tratamiento. Los niveles de estas poblaciones al final del seguimiento eran similares a los observados en el grupo de niños no infectados. En este grupo se observó también una tendencia a la disminución en los niveles de memoria atípica (Figura 22E). En cambio, los niveles de plasmablastos y memoria en reposo no cambiaron en los niños que no muestran cambios significativos en los niveles de anticuerpos específicos para *T. cruzi* (Figura 22B y 22D) y se observó un aumento de los niveles de memoria atípica a lo largo del seguimiento postratamiento (Figura 22F). Utilizando el análisis de modelo lineal mixto con interacción se confirma una clara diferencia en la cinética de cambios entre los grupos con tratamiento exitoso y no exitoso (Figura 22E y 22F).

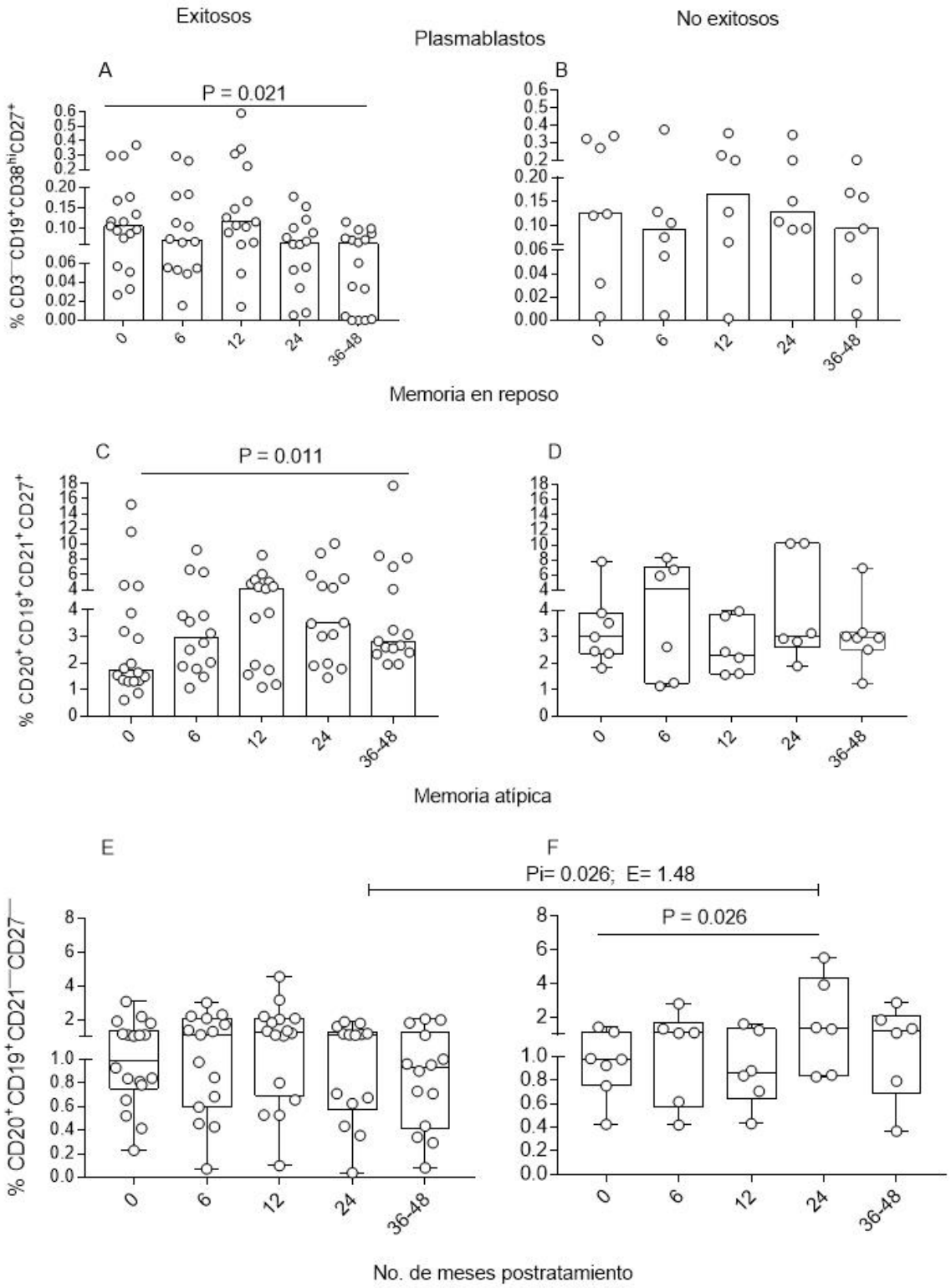

Figura 22. **Perfil fenotípico de linfocitos B totales en niños infectados por *T. cruzi* antes y después del tratamiento antiparasitario.** Las CMPs se tiñeron con una combinación del marcador de viabilidad E-Fluor Viability 780 y los anticuerpos monoclonales anti CD3, CD20, CD19, CD21 y CD27 y se analizaron mediante citometría de flujo. Las barras indican la mediana y el rango interquartilo 10-90 de la frecuencia de células B que expresan un fenotipo particular antes del tratamiento (tiempo 0) y a distintos tiempos después de la administración de benznidazol en niños que muestran una disminución en los anticuerpos específicos para *T. cruzi*

[A, C, E; n = 8] o niños que mantienen estables los títulos de anticuerpos [B, D, F; n = 8]. Los cambios de los valores con respecto al tiempo pretratamiento a lo largo de seguimiento se evaluaron usando un modelo mixto lineal para medidas repetidas con interacción de acuerdo con la respuesta terapéutica. Pi indica el valor de P significativo resultante de interacción. E indica el valor estimado del modelo mixto lineal. Los valores se relativizaron según el porcentaje individual de células B $CD19^{+}$.

Conclusiones parciales III

- Observamos una distribución anormal de células B en individuos con enfermedad de Chagas crónica, particularmente vemos un aumento en la frecuencia de plasmablastos y células B de memoria atípicas tanto en adultos como en niños infectados con *T. cruzi*.

- Los individuos adultos y los niños difieren en la población *naïve* activada la que se encuentra aumentada en adultos y disminuida en los niños comparado con los respectivos grupos no infectados. Posiblemente con el tiempo podría producirse un deterioro en la diferenciación de las células B *naïve* en plasmablastos en los pacientes adultos.

DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis realizamos un análisis ex vivo de la frecuencia y el fenotipo de las células B específicas para *T. cruzi* y periféricas totales en pacientes con enfermedad de Chagas crónica y su variación después de la quimioterapia antiparasitaria. Con el ensayo de ELISPOT estandarizado en este trabajo, pudimos detectar CSAs específicas para *T. cruzi* en la mayoría de los pacientes antes de recibir el tratamiento antiparasitario (Figura 9). El uso de un lisado derivado de la cepa Tulahuén, que se utiliza en el ensayo de ELISA para el diagnóstico de la infección con *T. cruzi*, resultó ser el antígeno más sensible para detectar CSAs (plasmablastos) específicas para *T. cruzi* en la circulación de individuos seropositivos. La cepa Tulahuén pertenece al DTU VI (Diosque 2014), que junto con el DTU V se encuentran representadas en Argentina (Brenière 2016; Murphy 2019). Con respecto al uso de proteínas recombinantes derivadas de *T. cruzi* fue necesario utilizar un conjunto de éstas para aumentar la tasa de positividad, dado que el reconocimiento es variable entre pacientes. Esta variabilidad inter paciente, concuerda con el perfil de reconocimiento de anticuerpos específicos para estas proteínas observado a través del ensayo de multiplex (Cooley 2008). En cambio, hubo una preponderancia de bajos niveles de células B de memoria en la circulación de estos pacientes (Figura 9).

Las bajas frecuencias de células B de memoria específicas para *T. cruzi* coinciden con las alteraciones en células B observadas en otras infecciones crónicas (Cooper 2020; Parodi 2020; Burton 2018). Sin embargo, dado que la detección de células B de memoria por la técnica de ELISPOT se basa en su capacidad para secretar anticuerpos luego de ser activadas en forma policlonal y posterior unión de las CSAs al antígeno específico, si existiera una disfunción de estas células podríamos estar subestimando sus niveles. En este sentido en humanos, está descripto que las infecciones crónicas persistentes no sólo inducen cambios en el compartimento de las células B de memoria, sino que también alteran su composición, como por ejemplo el incremento de células B de memoria atípicas observado en malaria (Portugal 2015; Portugal 2017). En el análisis utilizando las proteínas recombinantes para detectar células B específicas para el parásito, pudimos observar una proporción de células B de memoria clásica, entre las que encontramos memoria atípica, que son disfuncionales para secretar anticuerpos, como también un porcentaje importante de células B de memoria en reposo, las cuales quizás podrían pertenecer a un perfil intermedio. Por esto creemos que la detección de células B usando ELISPOT esta subestimada.

A diferencia de las células B de memoria generadas durante la etapa aguda de una infección que se caracterizan por la expresión de CD27 y CD21, las células B de memoria atípicas no expresan estos marcadores, es decir son $CD27^{-}CD21^{-}$. Este tipo fenotipo particular se asocia a infecciones crónicas, incluido el VIH (Moir 2008), malaria mencionada anteriormente (Portugal 2015), virus de la hepatitis C (Do 2014) e infección por citomegalovirus (Dauby 2014). Las células B de memoria atípicas se caracterizan por la expresión de marcadores que normalmente no expresan las células B de memoria clásicas, tales como T-bet, CD11c y varios receptores inhibitorios (Sanz 2019). Estas células presentan una menor capacidad para activarse a través de los receptores de células B y ejercer las funciones de proliferación, producción de citocinas o secreción de anticuerpos (Portugal 2015; Joosten 2016). En concordancia con lo observado en otras infecciones persistentes, en nuestro trabajo observamos una distribución anormal de células B en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, particularmente un aumento en los niveles de células B de memoria atípicas totales en adultos y niños infectados con *T. cruzi* (Figura 13).

Si bien los pacientes adultos y los niños comparten el aumento en los niveles de células B de memoria atípica y de plasmablastos en comparación a los respectivos grupos no infectados, los niños muestran niveles más bajos de células B *naïve* activadas mientras que en los pacientes adultos esta población está aumentada. Aunque no se alcanzó significancia estadística, los niveles de células B *naïve* parecen estar aumentados en los pacientes adultos (Figura 13). Estos hallazgos, respaldarían la idea de que a medida que persiste la infección habría un deterioro en la diferenciación a plasmablastos o se inducirían mecanismos compensatorios para mantener la población de plasmablastos aumentando el número de células B *naïve*. En la población de linfocitos T también se han observado diferencias en el fenotipo comparando niños y adultos infectados con *T.* cruzi (Albareda 2013). Cabe destacar, que los cambios observados en la población total de linfocitos se deberían a una activación general del compartimento T o B inducida por la persistencia antigénica que impactaría no sólo sobre las poblaciones de linfocitos específicas para el parásito.

Mediante el uso de proteínas recombinantes derivadas de *T. cruzi* marcadas con fluorocromos, que permitieron la cuantificación de las células B independientemente de su capacidad para secretar anticuerpos, pudimos detectar células B de memoria clásicas en reposo específicas para el parásito, pero con preponderancia de células B *naïve* en pacientes adultos (Figura 11). La proporción de células B específicas para *T. cruzi* con fenotipo de memoria atípica del total de células B específicas para las proteínas recombinantes evaluadas fue menor que la proporción de células B de memoria clásica y *naïve* independientemente de la forma clínica de los pacientes.

Como era de esperar, las células B de memoria atípicas no se encuentran dentro de las poblaciones productoras de IL-6 y TNF-α medidas mediante un análisis funcional luego de la estimulación policlonal de células B totales, ni en personas no infectadas como en aquellas infectadas con *T. cruzi*. En las formas clínicas más avanzadas de la enfermedad, se observó una mayor producción de IL-6 y TNF-α por parte de las células B *naïve* activadas con respecto a la producción por células de memoria clásica, indicando que a medida que progresa la enfermedad el sistema inmune recluta linfocitos *naïve* para compensar la falta de células B de memoria (Figura 15). Por lo tanto, es posible que los niveles de células de memoria específicas para *T. cruzi* sea mayor que el detectado por la técnica de ELISPOT.

Otros autores han demostrado un aumento de células B *naïve*/de transición en individuos infectados con *T. cruzi* sin signos de enfermedad cardíaca (Fernández 2014), contrastando con otros hallazgos que muestran un aumento en la frecuencia de células B de transición con capacidad de secretar IL-10 en respuesta a antígenos de *T. cruzi* sólo en pacientes con miocardiopatía (Girard 2021). En este último estudio, la estimulación con antígenos de *T. cruzi* indujo promovió un aumento en la población de células B $CD24^{-}CD27^{-}$ (Girard 2021) las que serían comparables a la población de células de memoria atípica $CD27^{-}CD21^{-}$ evaluadas en este trabajo de tesis. Sin embargo, nosotros no observamos diferencias en la producción de IL-10 ante el estímulo policlonal con R848 en ningún grupo clínico (Figura 14). Algunos autores postulan que la poca producción de IL-10 e incluso de IL-17 asociada con niveles altos de IFN-γ y TNF-α se correlaciona con el grado de compromiso cardíaco de la enfermedad, y plantean la existencia de un desbalance inmunológico producto de una deficiencia en linfocitos T reguladores (Guedes 2012). También se observó que la presencia de células B regulatorias $CD11b^{+}$ con capacidad para producir IL-10 se asocia con una función cardíaca conservada en pacientes con enfermedad de Chagas crónica (Passos 2019).

Estudios realizados en la fase aguda de la infección experimental con *T. cruzi* en ratones, muestran anomalías en el compartimento de células B (Minoprio 1988), tales como la activación policlonal de células del bazo (Bermejo 2010), el aumento de apoptosis en células B y una disminución en respuesta inmune humoral específica (Zúñiga 2005). Parte de estas alteraciones en células B le permitirían al parásito establecer una infección crónica. En este sentido, recientemente se ha observado que células B estimuladas con trypomastigotes in vitro, adquieren un fenotipo que regula negativamente la respuesta T colaboradora de tipo 1 (Somoza 2022). En cambio, la depleción de células B por el tratamiento con anticuerpos anti-CD20 en etapa aguda de la infección experimental con *T. cruzi* indujo una disminución en la respuesta T $CD8^{+}$

específica para el parásito (Fiocca Vernengo 2020) siendo en este último caso importante para desarrollo de inmunidad frente a *T. cruzi.*

Dado que el estándar para evaluar la efectividad del tratamiento en la enfermedad de Chagas crónica es la disminución de los títulos serológicos específicos para *T. cruzi,* y este cambio lleva muchos años en poder detectarse en pacientes adultos que responden al tratamiento, pensamos que la evaluación de los niveles o fenotipo de células B en la circulación podrían cambiar más rápidamente que los niveles de anticuerpos (y así ofrecer potencialmente un método alternativo y más rápido para evaluar la eficacia del tratamiento). Para abordar esta pregunta, nos basamos en la evaluación de estos parámetros de la respuesta celular B en dos grupos de pacientes con enfermedad de Chagas crónica que recibieron tratamiento antiparasitario: pacientes respondedores (considerado como tratamiento exitoso) y pacientes no respondedores al tratamiento (considerado como tratamiento no exitoso) utilizando la caída de títulos serológicos como parámetro de eficacia del tratamiento, ya sea a través de serología convencional y mediante el ensayo de multiplex. El principal hallazgo fue que las CSAs disminuyen concomitantemente con los niveles de anticuerpos específicos para *T. cruzi* medidos por el ensayo de multiplex, y estos cambios precedieron a una disminución de los anticuerpos específicos para *T. cruzi* medidos por serología convencional en el grupo de pacientes respondedores (Figura 19). Al final del seguimiento, las CSAs desaparecieron de la circulación sólo en los pacientes que mostraron una caída significativa de los títulos de anticuerpos anti *T. cruzi* (incluso en aquellos pacientes que no habían negativizado completamente la serología convencional).

Dos conclusiones principales se desprenden de este trabajo. En primer lugar, el tratamiento anti parasiticida induce un cese en la diferenciación de CSAs específicas para *T. cruzi* las que desaparecen de la circulación de los pacientes que responden al tratamiento. En segundo lugar, los anticuerpos anti *T. cruzi* que disminuyen después del tratamiento derivarían de estas CSAs dependientes de antígeno, mientras que los que persisten a pesar de la eliminación de las CSAs derivarían de células plasmáticas de larga vida cuya sobrevivencia es independientes de la presencia de antígeno. En este contexto, no resulta llamativo que la mayoría de los pacientes tratados no muestren seroconversión completa después de tratamiento etiológico. Por lo tanto, aunque la CSAs pueden disminuir relativamente rápido después de la potencial eliminación del parásito por efecto del tratamiento, los niveles de anticuerpos específicos disminuirían más lentamente. Lamentablemente no es posible determinar los niveles de células plasmáticas de

larga vida específicas para *T. cruzi* en los pacientes evaluados, pero la desaparición de los plasmablastos específicos permiten arribar a esta conclusión.

A pesar de que a las infecciones persistentes se las ha asociado con una disrupción en el balance entre las células plasmáticas de corta vida y de larga vida (Cooper 2020, Shaw 2017), el desarrollo de células plasmáticas de larga vida en la infección crónica con *T. cruzi* no estaría muy afectado. Posiblemente, los bajos niveles de parasitemia no impidan el mantenimiento de esta población de células B. Un estudio de infección experimental con el VIH en monos demostró que en presencia de bajos niveles de viremia las células plasmáticas de larga vida y los factores necesarios para su supervivencia en la médula ósea son mantenidos (Shaw 2017). También se ha observado que en infecciones virales crónicas se forman centros germinales persistentes con una fuerte respuesta de linfocitos T colaboradores foliculares (TcF) (Fallet B 2020). Dado que en las infecciones crónicas, la respuesta T $CD4^+$ colaboradora de tipo 1 puede sufrir un proceso de agotamiento (Kaufmann 2007; Albareda 2009; Gigley 2012; Albareda 2013), los TcF empiezan a dominar la respuesta T $CD4^+$, induciendo así la diferenciación de células plasmáticas de larga vida que pueden mantenerse en la médula ósea, órganos linfoides secundarios y en tejidos con inflamación activa (Lindqvist 2012).

Es sabido que los TcF de tipo 2 y los TcF productores de IL-17 son buenos colaboradores de las células B mediante la secreción de la citocina IL-21, mientras que el perfil TcF de tipo 1 es poco eficiente y suele estar asociado a una mala respuesta de anticuerpos (Schmitt 2014). Los pacientes asintomáticos tienen menor proporción de TcF de tipo 1 y mayor proporción de TcF secretores de IL-17 en su circulación (Quebrada Palacio, 2020). La citocina IL-6 es una señal clave para la inducción y diferenciación inicial de los TcF y se ha detectado en la circulación (Natale 2018; Natale 2021) y en monocitos (Sanmarco 2019; Gomez Olarte 2019) de pacientes en etapa crónica de la infección. En esta tesis mostramos que la IL-6 también es producida por células B.

La terapia antiparasitaria no aumentó los bajos niveles de células B de memoria específicas para *T. cruzi* incluso en niños, probablemente debido a que la intervención del tratamiento no se realizó tempranamente en la infección crónica o como mencionamos anteriormente, su número podría estar subestimado. Luego del tratamiento etiológico, si observamos la restauración del fenotipo de células B totales en los pacientes que responden favorablemente al mismo. Estos cambios, fueron más rápidos en los niños infectados con *T. cruzi* en comparación con los adultos, lo que podría explicarse por los menores signos de agotamiento inmunológico encontrado en los

niños (Albareda 2013) (Figura 21 y 22). Actualmente se plantea la idea de que el sistema inmune del huésped podría actuar en forma sinérgica con la droga parasiticida (Albareda 2018; Egui 2020; Castro Eiro 2021). Es de destacar que los pacientes adultos que presentaban niveles elevados de CSAs específicas para *T. cruzi* y de linfocitos T *naïve* totales activados antes de iniciar el tratamiento, tuvieron una mejor respuesta a la terapia antiparasitaria. En cambio, la mayoría de los pacientes que presentaron una respuesta no exitosa al tratamiento tenían bajos niveles de CSAs específicas para *T. cruzi* y de células B *naïve* activadas totales antes del tratamiento, y no mostraron cambios a nivel de fenotipo de las células B en el seguimiento postratamiento. Además de la acción de los anticuerpos, las células B secretan citocinas inflamatorias (Duddy 2004), tal como observamos en el presente estudio, y éstas podrían facilitar la eliminación o control de la infección. En un modelo experimental de infección con *T. cruzi* en ratones, la inhibición del estimulador de linfocitos B (BAFF), que es un factor importante en la sobrevida de las células B, aumentó el parasitismo en el corazón demostrando un rol importante de los linfocitos B en el control de la replicación del parásito en tejidos (Bermejo 2010).

Dado que se ha demostrado que existe una correlación entre la carga antigénica y la formación y persistencia de células B de memoria atípicas en infecciones por VIH (Ferreira 2013) como también en *Plasmodium falciparum* (Perez-Mazliah 2018), la reducción de la carga parasitaria observada en adultos y niños infectados por *T. cruzi* después del tratamiento podría ser suficiente para normalizar el fenotipo total de células B. Recientemente, hemos demostrado que pacientes infectados con *T. cruzi* que lograron una disminución en los títulos de anticuerpos específicos hacia el parásito luego del tratamiento con benznidazol presentan un aumento en la respuesta polifuncional de linfocitos T $CD4^+$ específicos para *T. cruzi*, una disminución en los niveles de citocinas proinflamatorias y un aumento en los niveles de linfocitos T $CD4^+$ totales de memoria central y *naïve* (Castro Eiro 2021). En conjunto estos resultados muestran que el tratamiento antiparasitario permite restaurar en cierto grado los compartimentos de linfocitos T y B.

A pesar de las CSAs disminuyen antes que los niveles de anticuerpos durante el seguimiento postratamiento, se requirió una mediana de seguimiento de 5 años en adultos y de 2 años en niños para observar la eliminación completa de las CSAs específicas de *T. cruzi* después del tratamiento exitoso establecido por la disminución de anticuerpos anti *T. cruzi* medidos por serología convencional y/o por el ensayo de multiplex (Albareda 2018; Castro Eiro 2021). Este resultado fue inesperado, ya que estudios previos han mostrado niveles elevados de

plasmablastos específicos de patógenos durante una infección activa, aguda (Kochayoo 2021) o crónica (Van de Wijer 2021), y su eliminación una vez resuelta la infección (Claireaux 2018).

Por ello una de las preguntas principales que surgen es cuál es el estímulo que mantiene las CSAs después de la eliminación aparente de *T. cruzi* por efecto del tratamiento. Una posibilidad es que los parásitos persistan en un nivel muy bajo después del tratamiento y continúen estimulando las células B hasta que el sistema inmunológico del huésped pueda eliminar por completo la infección (Figura 23). Además, existe la posibilidad de que parásitos en estado de latencia, que no serían alcanzados por la acción del benznidazol, sean los responsables de la lenta disminución de los plasmablastos específicos para *T. cruzi* (Sánchez-Valdéz 2018). Por lo tanto, el tratamiento con benznidazol podría establecer las condiciones necesarias para la eliminación completa de los parásitos y así de los antígenos parasitarios, pero esto requiere de un tiempo prologado postratamiento.

Una segunda posibilidad es que los antígenos de *T. cruzi* sean retenidos por largo tiempo por células presentadoras de antígeno, incluso en ausencia de parásitos (Figura 23). Los macrófagos y las células dendríticas pueden vivir décadas en los tejidos (Guilliams 2020) y se ha demostrado la persistencia de antígenos virales durante muchos meses después de la resolución de infecciones agudas (Zamit 2006; Yewdell 2021; Uddbäck 2021; Doan 2022). En el modelo experimental usando macacos rhesus con infección aguda con sarampión, se demostró que aunque el virus se elimina rápidamente, la persistencia del ARN viral mantiene la estimulación de los centros germinales en los tejidos linfoideos, generando CSAs hasta 6 meses posteriores a la infección (Nelson 2020). Si bien hay pocos ejemplos de tratamientos que curan infecciones crónicas en humanos para comparar, se puede mencionar que en la infección con hepatitis C se detectaron trazas de ARN del virus en algunos pacientes hasta 9 años después de una respuesta viral sostenida bajo tratamiento con IFN-γ, lo que se considera como cura de la infección (Hedenstierna 2015). En ese estudio, los autores afirman que los bajos niveles de ARN pueden promover la respuesta de células T y células B específicas para el virus, que serían las responsables de la desaparición completa del ARN viral a largo plazo.

Otra posibilidad es que las CSAs generadas durante décadas de infección crónica como en el caso de la infección con *T. cruzi* adquieran una mayor capacidad de supervivencia en comparación con las que se generan mediante la vacunación o una infección aguda (Figura 23). La mayoría de los estudios documentan la rápida disminución de las CSAs después de la resolución de infecciones a corto plazo, pero el impacto en la longevidad de las CSAs no ha sido

estudiado. En nuestro estudio, la desaparición más rápida de las CSAs en los niños tratados en comparación con los adultos sería consistente con cualquiera de estas hipótesis, y es también consistente con otras diferencias inmunológicas observadas entre personas con menor y mayor tiempo de evolución de la infección, como el menor grado de agotamiento en las células T (Albareda 2013, Albareda 2018) y la disminución más rápida de los niveles de anticuerpos específicos para *T. cruzi* después de la terapia parasiticida (Sosa Stani 2009) .

Estos hallazgos respaldan que las CSAs inducidas por antígeno y los anticuerpos producidos por estas células, eventualmente desaparecen de la circulación después de un tratamiento exitoso, mientras que los anticuerpos anti *T. cruzi* derivados de células plasmáticas de larga vida persistirán por más tiempo después de la terapia. La disminución simultánea de CSAs y anticuerpos anti *T. cruzi* determinados mediante el ensayo multiplex confirma la utilidad del ensayo basado en Luminex para determinar la eficacia del tratamiento. La medición de las CSAs específicas para *T. cruzi* emergen como una herramienta de investigación para la evaluación de potenciales nuevos tratamientos.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Estos hallazgos brindan una nueva perspectiva sobre las alteraciones de la respuesta de las células B en el contexto de la enfermedad de Chagas crónica y respaldan la hipótesis de que las células plasmáticas de larga vida podrían enmascarar la desaparición de los anticuerpos específicos para *T. cruzi* producidos por la diferenciación de plasmablastos dependiente de la presencia de antígenos parasitarios. La desaparición de las CSAs ocurre no sólo ante la negativización completa de anticuerpos específicos para *T. cruzi* sino también cuando los niveles de éstos caen significativamente después del tratamiento específico.

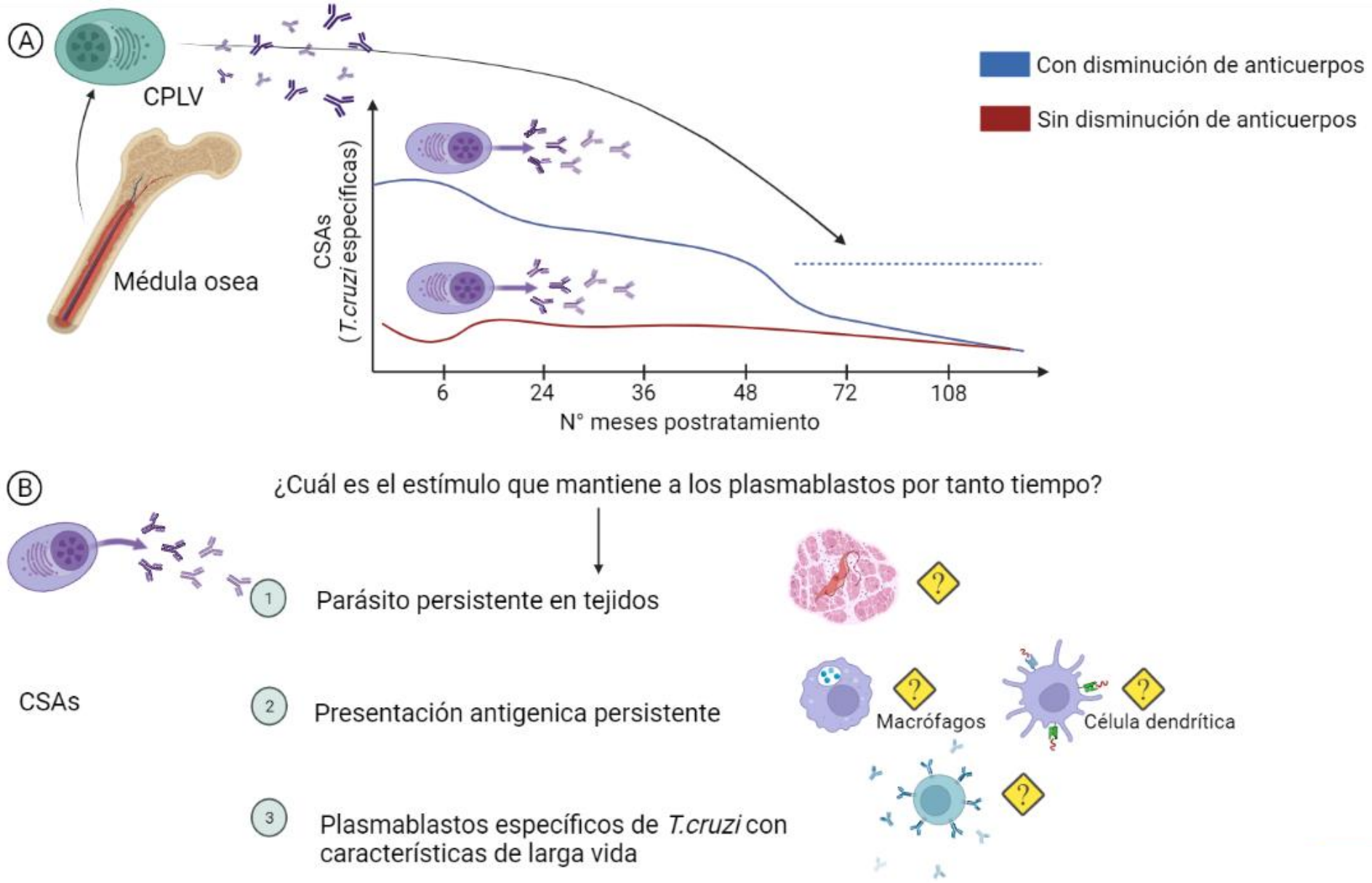
A
CPLV
Médula osea
Con disminución de anticuerpos
Sin disminución de anticuerpos
CSAs
(T.cruzi específicas)
6
24
36
48
72
108
N° meses postratamiento
B
¿Cuál es el estímulo que mantiene a los plasmablastos por tanto tiempo?
CSAs
1
Parásito persistente en tejidos
2
Presentación antigenica persistente
Macrófagos
Célula dendrítica
3
Plasmablastos específicos de T.cruzi con características de larga vida

Figura 23. Cinética de los cambios en las CSAs específicas para *T. cruzi* en la etapa crónica de la enfermedad en pacientes que responden favorablemente al tratamiento antiparasitario. (A) Se esquematiza la cinética de evolución de las CSAs (plasmablastos) específicos para *T. cruzi* por ELISPOT de los individuos que respondieron al tratamiento (con disminución de anticuerpos específicos para *T. cruzi*, línea azul) comparado con los que no respondieron (sin disminución de anticuerpos, línea roja). Los anticuerpos específicos para *T. cruzi* que provienen de las células plasmáticas de larga vida (CPLV) en médula ósea podrían enmascarar la caída de anticuerpos provenientes de plasmablastos dependientes de antígenos. (B) Potenciales mecanismos de mantenimiento de las CSAs específicas para *T. cruzi* en pacientes que responden favorablemente al tratamiento antiparasitario. (1) Persistencia del parásito en bajos niveles en tejidos; (2) Los antígenos de *T. cruzi* son retenidos a largo plazo y presentados por células presentadoras de antígeno en ausencia de parásitos persistentes y (3) Las CSAs generadas en infecciones crónicas como *T. cruzi* adquieren capacidad de mayor supervivencia, similar a las que presentan las células plasmáticas de larga vida, en comparación con las que se generan mediante la vacunación o una infección aguda.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

Abel, L. C., Rizzo, L. V., Ianni, B., Albuquerque, F., Bacal, F., Carrara, D., Bocchi, E. A., Teixeira, H. C., Mady, C., Kalil, J., & Cunha-Neto, E. (2001). Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to Trypanosoma cruzi infection. Journal of Autoimmunity, 17(1), 99–107.

Acevedo, G. R., Alcaráz, P. B., Pinilla, C., & Gómez, K. A. (2019). Generation of T. cruzi-Specific Primary CD4+ T Cell Lines from Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolated from Chagas Disease Patients. Methods in Molecular Biology , 1955, 315–337.

Acevedo, G. R., Girard, M. C., & Gómez, K. A. (2018). The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. Frontiers in Immunology, 9, 1929.

Acosta-Rodríguez, E. V., Montes, C. L., Motrán, C. C., Zuniga, E. I., Liu, F.-T., Rabinovich, G. A., & Gruppi, A. (2004). Galectin-3 Mediates IL-4-Induced Survival and Differentiation of B Cells: Functional Cross-Talk and Implications duringTrypanosoma cruziInfection. In The Journal of Immunology (Vol. 172, Issue 1, pp. 493–502). https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.493

Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Zavala-Jaspe, R., Suarez, J. A., Abate, T., Naranjo, L., Paiva, M., Rivas, L., Castro, J., Márques, J., Mendoza, I., Acquatella, H., Torres, J., & Noya, O. (2010). Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. The Journal of Infectious Diseases, 201(9), 1308–1315.

Albareda, M. C., Laucella, S. A., Álvarez, M. G., Armenti, A. H., Bertochi, G., Tarleton, R. L., & Postan, M. (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., Olivera, G. C., Laucella, S. A., Álvarez, M. G., Fernandez, E. R., Lococo, B., Viotti, R., Tarleton, R. L., & Postan, M. (2009). Chronic human infection with Trypanosoma cruzi drives CD4+ T cells to immune senescence. Journal of Immunology , 183(6), 4103–4108.

Albareda, M. C., De Rissio, A. M., Tomas, G., Serjan, A., Álvarez, M. G., Viotti, R., Fichera, L. E., Esteva, M. I., Potente, D., Armenti, A., Tarleton, R. L., & Laucella, S. A. (2013). Polyfunctional T cell responses in children in early stages of chronic Trypanosoma cruzi infection contrast with monofunctional responses of long-term infected adults. PLoS Neglected Tropical Diseases, 7(12), e2575.

Albareda, M. C., Perez-Mazliah, D., Natale, M. A., Castro-Eiro, M., Álvarez, M. G., Viotti, R., Bertocchi, G., Lococo, B., Tarleton, R. L., & Laucella, S. A. (2015). Perturbed T cell IL-7 receptor signaling in chronic Chagas disease. Journal of Immunology, 194(8), 3883–3889.

Albareda, M. C., Natale, M. A., De Rissio, A. M., Fernandez, M., Serjan, A., Álvarez, M. G., Cooley, G., Shen, H., Viotti, R., Bua, J., Castro Eiro, M. D., Nuñez, M., Fichera, L. E., Lococo, B., Scollo, K., Tarleton, R. L., & Laucella, S. A. (2018). Distinct Treatment Outcomes of Antiparasitic Therapy in Trypanosoma cruzi-Infected Children Is Associated With Early Changes in Cytokines, Chemokines, and T-Cell Phenotypes. In Frontiers in Immunology (Vol. 9).

Allie SR, Randall TD. Resident Memory B Cells. Viral Immunol. 2020 May;33(4):282-293. doi: 10.1089/vim.2019.0141. Epub 2020 Feb 5. PMID: 32023188; PMCID: PMC7247033.

Alonso-Padilla, J., López, M. C., Esteva, M., Zrein, M., Casellas, A., Gómez, I., Granjon, E., Méndez, S., Benítez, C., Ruiz, A. M., Sanz, S., Gascón, J., Thomas, M. C., Pinazo, M.-J., & NHEPACHA Study Group. (2021). Serological reactivity against T. cruzi-derived antigens: Evaluation of their suitability for the assessment of response to treatment in chronic Chagas disease. Acta Tropica, 221, 105990.

Altcheh, J., Corral, R., Biancardi, M. A., & Freilij, H. (2003). [Anti-F2/3 antibodies as cure marker in children with congenital Trypanosoma cruzi infection]. Medicina, 63(1), 37–40.

Altcheh, J., Moscatelli, G., Moroni, S., Garcia-Bournissen, F., & Freilij, H. (2011). Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas disease. Pediatrics, 127(1), e212–e218.

Álvarez, M. G., Postan, M., Weatherly, D. B., Albareda, M. C., Sidney, J., Sette, A., Olivera, C., Armenti, A. H., Tarleton, R. L., & Laucella, S. A. (2008). HLA Class I-T cell epitopes from

trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8+ T cells in chronic Chagas disease. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2(9), e288.

Álvarez, M. G., Vigliano, C., Lococo, B., Petti, M., Bertocchi, G., & Viotti, R. (2012). Seronegative conversion after incomplete benznidazole treatment in chronic Chagas disease. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 106(10), 636–638.

Álvarez, M. G., Bertocchi, G. L., Cooley, G., Albareda, M. C., Viotti, R., Perez-Mazliah, D. E., Lococo, B., Castro Eiro, M., Laucella, S. A., & Tarleton, R. L. (2016). Treatment Success in Trypanosoma cruzi Infection Is Predicted by Early Changes in Serially Monitored Parasite-Specific T and B Cell Responses. PLoS Neglected Tropical Diseases, 10(4), e0004657.

Álvarez, M. G., Vigliano, C., Lococo, B., Bertocchi, G., & Viotti, R. (2017). Prevention of congenital Chagas disease by Benznidazole treatment in reproductive-age women. An observational study. Acta Tropica, 174, 149–152.

Álvarez, M. G., Ramírez, J. C., Bertocchi, G., Fernández, M., Hernández, Y., Lococo, B., Lopez-Albizu, C., Schijman, A., Cura, C., Abril, M., Laucella, S., Tarleton, R. L., Natale, M. A., Castro Eiro, M., Sosa-Estani, S., & Viotti, R. (2020). New Scheme of Intermittent Benznidazole Administration in Patients Chronically Infected with Trypanosoma cruzi: Clinical, Parasitological, and Serological Assessment after Three Years of Follow-Up. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 64(9). https://doi.org/10.1128/AAC.00439-20

Bahia-Oliveira, L. M., Gomes, J. A., Cançado, J. R., Ferrari, T. C., Lemos, E. M., Luz, Z. M., Moreira, M. C., Gazzinelli, G., & Correa-Oliveira, R. (2000). Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of Trypanosoma cruzi infection 14-30 years ago. The Journal of Infectious Diseases, 182(2), 634–638.

Barclay, C. A., Cerisola, J. A., Lugones, H., Ledesma, O., Lopez Silva, J., & Mouzo, G. (1978). Aspectos farmacológicos y resultados terapéuticos del benznidazol en el tratamiento de la infección chagásica. La Prensa Médica Argentina, 65(7), 239–244.

Bermejo, D. A., Amezcua-Vesely, M. C., Montes, C. L., Merino, M. C., Gehrau, R. C., Cejas, H., Acosta-Rodríguez, E. V., & Gruppi, A. (2010). BAFF mediates splenic B cell response and

antibody production in experimental Chagas disease. PLoS neglected tropical diseases, 4(5), e679.

Bermejo, D. A., Amezcua Vesely, M. C., Khan, M., Acosta Rodríguez, E. V., Montes, C. L., Merino, M. C., Toellner, K. M., Mohr, E., Taylor, D., Cunningham, A. F., & Gruppi, A. (2011). Trypanosoma cruzi infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. Immunology, 132(1), 123–133.

Bermejo, D. A., Jackson, S. W., Gorosito-Serran, M., Acosta-Rodriguez, E. V., Amezcua-Vesely, M. C., Sather, B. D., Singh, A. K., Khim, S., Mucci, J., Liggitt, D., Campetella, O., Oukka, M., Gruppi, A., & Rawlings, D. J. (2013). Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors RORγt and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. Nature Immunology, 14(5), 514–522.

Billot, C., Torrico, F., & Carlier, Y. (2005). [Cost effectiveness study of a control program of congenital Chagas disease in Bolivia]. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 38 Suppl 2, 108–113.

Boainain, E., & Rassi, A. (1979). [Etiologic therapy of Chagas' disease]. Arquivos brasileiros de cardiologia, 32(6), 395–399.

Borda, E., Pascual, J., Cossio, P., De La Vega, M., Arana, R., & Sterin-Borda, L. (1984). A circulating IgG in Chagas' disease which binds to beta-adrenoceptors of myocardium and modulates their activity. Clinical and Experimental Immunology, 57(3), 679–686.

Bortnick, A., Chernova, I., Quinn, W. J., 3rd, Mugnier, M., Cancro, M. P., & Allman, D. (2012). Long-lived bone marrow plasma cells are induced early in response to T cell-independent or T cell-dependent antigens. Journal of Immunology , 188(11), 5389–5396.

Bradford MM. (1975). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999. PMID: 942051.

Brener, Z. (1987). Laboratory-acquired Chagas disease: comment. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 81(3), 527.

Brenière, S. F., Waleckx, E., & Barnabé, C. (2016). Over Six Thousand Trypanosoma cruzi Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. PLoS neglected tropical diseases, 10(8), e0004792.

Britto, C. C. (2009). Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, 104 Suppl 1, 122–135.

Bua J, Volta BJ, Perrone AE, Scollo K, Velázquez EB, Ruiz AM, De Rissio AM, Cardoni RL. (2013). How to improve the early diagnosis of Trypanosoma cruzi infection: relationship between validated conventional diagnosis and quantitative DNA amplification in congenitally infected children. PLoS Negl Trop Dis. 2013 Oct 17;7(10):e2476. doi: 10.1371/journal.pntd.0002476. PMID: 24147166; PMCID: PMC3798617.

Burgos, J. M., Diez, M., Vigliano, C., Bisio, M., Risso, M., Duffy, T., Cura, C., Brusses, B., Favaloro, L., Leguizamon, M. S., Lucero, R. H., Laguens, R., Levin, M. J., Favaloro, R., & Schijman, A. G. (2010). Molecular identification of Trypanosoma cruzi discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 51(5), 485–495.

Burton, A. R., Pallett, L. J., McCoy, L. E., Suveizdyte, K., Amin, O. E., Swadling, L., Alberts, E., Davidson, B. R., Kennedy, P. T., Gill, U. S., Mauri, C., Blair, P. A., Pelletier, N., & Maini, M. K. (2018). Circulating and intrahepatic antiviral B cells are defective in hepatitis B. The Journal of clinical investigation, 128(10), 4588–4603.

Cardillo, F., Postol, E., Nihei, J., Aroeira, L. S., Nomizo, A., & Mengel, J. (2007). B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection. Immunology, 122(4), 584–595.

Carmona, S. J., Sartor, P. A., Leguizamón, M. S., Campetella, O. E., & Agüero, F. (2012). Diagnostic peptide discovery: prioritization of pathogen diagnostic markers using multiple

features. PloS One, 7(12), e50748.

Castro Eiro, M. D., Natale, M. A., Álvarez, M. G., Shen, H., Viotti, R., Lococo, B., Bua, J., Nuñez, M., Bertocchi, G. L., Albareda, M. C., Cesar, G., Tarleton, R. L., & Laucella, S. A. (2021). Reduced Trypanosoma cruzi-specific humoral response and enhanced T cell immunity after treatment interruption with benznidazole in chronic Chagas disease. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 76(6), 1580–1592.

Ceccarelli, S., Balsalobre, A., Cano, M. E., Canale, D., Lobbia, P., Stariolo, R., Rabinovich, J. E., & Marti, G. A. (2020). Analysis of Chagas disease vectors occurrence data: the Argentinean triatomine species database. Biodiversity data journal, 8, e58076.

Chagas, C., 1909. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz [en línea], vol. 1, no. 2, pp. 159-218. ISSN 0074-0276. DOI 10.1590/S0074-02761909000200008.

Claireaux, M., Galperin, M., Benati, D., Nouël, A., Mukhopadhyay, M., Klingler, J., de Truchis, P., Zucman, D., Hendou, S., Boufassa, F., Moog, C., Lambotte, O., & Chakrabarti, L. A. (2018). A High Frequency of HIV-Specific Circulating Follicular Helper T Cells Is Associated with Preserved Memory B Cell Responses in HIV Controllers. mBio, 9(3), e00317-18.

Cooley, G., Etheridge, R. D., Boehlke, C., Bundy, B., Weatherly, D. B., Minning, T., Haney, M., Postan, M., Laucella, S., & Tarleton, R. L. (2008). High throughput selection of effective serodiagnostics for Trypanosoma cruzi infection. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2(10), e316.

Cooper, L., & Good-Jacobson, K. L. (2020). Dysregulation of humoral immunity in chronic infection. Immunology and cell biology, 98(6), 456–466.

Cuellar, A., Rojas, F., Bolaños, N., Diez, H., Carmen Thomas, M., Rosas, F., Velasco, V., López, M. C., González, J. M., & Puerta, C. (2009). Natural CD4 + T-cell responses against Trypanosoma cruzi KMP-11 protein in chronic chagasic patients. Immunology and Cell Biology, 87(2), 149–153.

Cura, EN , Ruiz AM , Velázquez E , Malagrino N , Örn A , Segura E. (1993). Estandarización de un kit de confirmación (Fatala Kit) para el immunodiagnóstico para infección para Trypanosoma cruzi . Medicina (B Aires) 53 (Suppl 1): 82.

Dauby, N., Kummert, C., Lecomte, S., Liesnard, C., Delforge, M. L., Donner, C., & Marchant, A. (2014). Primary human cytomegalovirus infection induces the expansion of virus-specific activated and atypical memory B cells. The Journal of infectious diseases, 210(8), 1275–1285.

De Araújo, F. F., Corrêa-Oliveira, R., Rocha, M. O. C., Chaves, A. T., Fiuza, J. A., Fares, R. C. G., Ferreira, K. S., Nunes, M. C. P., Keesen, T. S., Damasio, M. P. S., Teixeira-Carvalho, A., & Gomes, J. A. S. (2012). Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. Immunobiology, 217(8), 768–777.

Diosque, P., Tomasini, N., Lauthier, J. J., Messenger, L. A., Monje Rumi, M. M., Ragone, P. G., Alberti-D'Amato, A. M., Pérez Brandán, C., Barnabé, C., Tibayrenc, M., Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Miles, M. A., & Yeo, M. (2014). Optimized multilocus sequence typing (MLST) scheme for Trypanosoma cruzi. PLoS neglected tropical diseases, 8(8), e3117.

Doan, T. A., Forward, T., & Tamburini, B. (2022). Trafficking and retention of protein antigens across systems and immune cell types. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 79(5), 275.

Docampo, R., & Stoppani, A. O. (1979). Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in Trypanosoma cruzi. Archives of Biochemistry and Biophysics, 197(1), 317–321.

Doi, H., Tanoue, S., & Kaplan, D. E. (2014). Peripheral CD27-CD21- B-cells represent an exhausted lymphocyte population in hepatitis C cirrhosis. Clinical immunology,150(2), 184–191.

Dosenovic, P., Chakrabarti, B., Soldemo, M., Douagi, I., Forsell, M. N., Li, Y., Phogat, A., Paulie, S., Hoxie, J., Wyatt, R. T., & Karlsson Hedestam, G. B. (2009). Selective expansion of HIV-1 envelope glycoprotein-specific B cell subsets recognizing distinct structural elements following immunization. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 183(5), 3373–3382.

Duddy, M. E., Alter, A., & Bar-Or, A. (2004). Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation?. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 172(6), 3422–3427.

Dutra, W. O., Menezes, C. A. S., Magalhães, L. M. D., & Gollob, K. J. (2014). Immunoregulatory networks in human Chagas disease. Parasite Immunology, 36(8), 377–387.

Egui, A., López, M. C., Gómez, I., Simón, M., Segovia, M., & Thomas, M. C. (2020). Differential phenotypic and functional profile of epitope-specific cytotoxic CD8+ T cells in benznidazole-treated chronic asymptomatic Chagas disease patients. Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Basis of Disease, 1866(3), 165629.

Egui, A., Carmen Thomas, M., Carrilero, B., Segovia, M., Alonso, C., Marañón, C., & López, M. C. (2015). Differential Phenotypic and Functional Profiles of TcCA-2 -Specific Cytotoxic CD8 T Cells in the Asymptomatic versus Cardiac Phase in Chagasic Patients. In PLOS ONE (Vol. 10, Issue 3, p. e0122115).

Fabbro, D. L., Streiger, M. L., Arias, E. D., Bizai, M. L., del Barco, M., & Amicone, N. A. (2007). Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 40(1), 1–10.

Fallet, B., Hao, Y., Florova, M., Cornille, K., de Los Aires, A. V., Girelli Zubani, G., Ertuna, Y. I., Greiff, V., Menzel, U., Hammad, K., Merkler, D., Reddy, S. T., Weill, J. C., Reynaud, C. A., & Pinschewer, D. D. (2020). Chronic Viral Infection Promotes Efficient Germinal Center B Cell Responses. Cell reports, 30(4), 1013–1026.e7.

Feldman, A. M., & McNamara, D. (2000). Myocarditis. The New England Journal of Medicine, 343(19), 1388–1398.

Fernández, E. R., Olivera, G. C., Quebrada Palacio, L. P., González, M. N., Hernandez-Vasquez, Y., Sirena, N. M., Morán, M. L., Ledesma Patiño, O. S., & Postan, M. (2014). Altered distribution of peripheral blood memory B cells in humans chronically infected with Trypanosoma cruzi. PloS One, 9(8), e104951.

Ferreira, C. B., Merino-Mansilla, A., Llano, A., Pérez, I., Crespo, I., Llinas, L., Garcia, F., Gatell, J. M., Yuste, E., & Sanchez-Merino, V. (2013). Evolution of broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing activity: therapy-associated decline, positive association with detectable viremia, and partial restoration of B-cell subpopulations. Journal of virology, 87(22), 12227–12236.

Fink K. (2012). Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections. Frontiers in immunology, 3, 78.

Fiocca Vernengo, F., Beccaria, C. G., Araujo Furlan, C. L., Tosello Boari, J., Almada, L., Gorosito Serrán, M., Gazzoni, Y., Montes, C. L., Acosta Rodríguez, E. V., & Gruppi, A. (2020). CD8+ T Cell Immunity Is Compromised by Anti-CD20 Treatment and Rescued by Interleukin-17A. mBio, 11(3), e00447-20.

Gigley, J. P., Bhadra, R., Moretto, M. M., & Khan, I. A. (2012). T cell exhaustion in protozoan disease. Trends in parasitology, 28(9), 377–384.

Giraldo, N. A., Bolaños, N. I., Cuellar, A., Roa, N., Cucunubá, Z., Rosas, F., Velasco, V., Puerta, C. J., & González, J. M. (2013). T lymphocytes from chagasic patients are activated but lack proliferative capacity and down-regulate CD28 and CD3ζ. PLoS Neglected Tropical Diseases, 7(1), e2038.

Girard, M. C., Ossowski, M. S., Muñoz-Calderón, A., Fernández, M., Hernández-Vásquez, Y., Chadi, R., & Gómez, K. A. (2021). Trypanosoma cruzi Induces Regulatory B Cell Alterations in Patients With Chronic Chagas Disease. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11, 723549.

Gironès, N., Cuervo, H., & Fresno, M. (2005). Trypanosoma cruzi-induced molecular mimicry and Chagas' disease. Current Topics in Microbiology and Immunology, 296, 89–123.

Gomes, J. A. S., Bahia-Oliveira, L. M. G., Rocha, M. O. C., Martins-Filho, O. A., Gazzinelli, G., & Correa-Oliveira, R. (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. S., Molica, A. M., Keesen, T. S. L., Morato, M. J. F., de Araujo, F. F., Fares, R. C.

G., Fiuza, J. A., Chaves, A. T., Pinheiro, V., do Carmo Pereira Nunes, M., Correa-Oliveira, R., & da Costa Rocha, M. O. (2014). Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of Chagas disease. In Human Immunology (Vol. 75, Issue 1, pp. 20–28).

Gómez-Olarte, S., Bolaños, N. I., Echeverry, M., Rodríguez, A. N., Cuéllar, A., Puerta, C. J., Mariño, A., & González, J. M. (2019). Intermediate Monocytes and Cytokine Production Associated With Severe Forms of Chagas Disease. Frontiers in immunology, 10, 1671.

Guedes, P. M. M., Gutierrez, F. R. S., Silva, G. K., Dellalibera-Joviliano, R., Rodrigues, G. J., Bendhack, L. M., Rassi, A., Jr, Rassi, A., Schmidt, A., Maciel, B. C., Marin Neto, J. A., & Silva, J. S. (2012). Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. PLoS Neglected Tropical Diseases, 6(4), e1630.

Guilliams, M., Thierry, G. R., Bonnardel, J., & Bajenoff, M. (2020). Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. Immunity, 52(3), 434–451.

Gürtler, R. E. (2009). Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco Region: current challenges and possible approaches. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, 104 Suppl 1, 52–59.

Gutierrez, F. R. S., Guedes, P. M. M., Gazzinelli, R. T., & Silva, J. S. (2009). The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. Parasite Immunology, 31(11), 673–685.

Hasslocher-Moreno, A. M., do Brasil, P. E. A. A., de Sousa, A. S., Xavier, S. S., Chambela, M. C., & Sperandio da Silva, G. M. (2012). Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67(5), 1261–1266.

Hedenstierna, M., Weiland, O., Brass, A., Bankwitz, D., Behrendt, P., Uhnoo, I., Aleman, S., Cardell, K., Fryden, A., Norkrans, G., Eilard, A., Glaumann, H., Pietschmann, T., Sällberg, M., & Brenndörfer, E. D. (2015). Long-term follow-up of successful hepatitis C virus therapy: waning immune responses and disappearance of liver disease are consistent with cure. Alimentary pharmacology & therapeutics, 41(6), 532–543.

Higuchi, M. de L., De Brito, T., Martins Reis, M., Barbosa, A., Bellotti, G., Pereira-Barreto, A. C., & Pileggi, F. (1993). Correlation between Trypanosoma cruzi parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology, 2(2), 101–106.

Jones, E. M., Colley, D. G., Tostes, S., Lopes, E. R., Vnencak-Jones, C. L., & McCurley, T. L. (1993). Amplification of a Trypanosoma cruzi DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 48(3), 348–357.

Joosten, S. A., van Meijgaarden, K. E., Del Nonno, F., Baiocchini, A., Petrone, L., Vanini, V., Smits, H. H., Palmieri, F., Goletti, D., & Ottenhoff, T. H. M. (2016). Patients with Tuberculosis Have a Dysfunctional Circulating B-Cell Compartment, Which Normalizes following Successful Treatment. PLoS Pathogens, 12(6), e1005687.

Kaplan, D. E. (2017). Persistence of exhaustion in cured hep C [Review of Persistence of exhaustion in cured hep C]. Blood, 130(1), 4.

Kardava, L., Moir, S., Wang, W., Ho, J., Buckner, C. M., Posada, J. G., O'Shea, M. A., Roby, G., Chen, J., Sohn, H. W., Chun, T.-W., Pierce, S. K., & Fauci, A. S. (2011). Attenuation of HIV-associated human B cell exhaustion by siRNA downregulation of inhibitory receptors. In Journal of Clinical Investigation (Vol. 121, Issue 7, pp. 2614–2624).

Kaufmann, D. E., Kavanagh, D. G., Pereyra, F., Zaunders, J. J., Mackey, E. W., Miura, T., Palmer, S., Brockman, M., Rathod, A., Piechocka-Trocha, A., Baker, B., Zhu, B., Le Gall, S., Waring, M. T., Ahern, R., Moss, K., Kelleher, A. D., Coffin, J. M., Freeman, G. J., Rosenberg, E. S., … Walker, B. D. (2007). Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. Nature immunology, 8(11), 1246–1254.

Knox, J. J., Myles, A., & Cancro, M. P. (2019). T-bet+ memory B cells: Generation, function, and fate. Immunological Reviews, 288(1), 149–160.

Koberle, F. (1974). Pathogenesis of Chagas' disease. Ciba Foundation Symposium, 20, 137.

Kochayoo, P., Sanguansuttikul, P., Thawornpan, P., Wangriatisak, K., Adams, J. H., Ntumngia, F. B., & Chootong, P. (2021). The presence of circulating antibody secreting cells and long-lived memory B cell responses to reticulocyte binding protein 1a in Plasmodium vivax patients. Malaria journal, 20(1), 474.

Kometani, K., & Kurosaki, T. (2015). Differentiation and maintenance of long-lived plasma cells. Current Opinion in Immunology, 33, 64–69.

Krauth-Siegel, R. L., Meiering, S. K., & Schmidt, H. (2003). The parasite-specific trypanothione metabolism of trypanosoma and leishmania. Biological Chemistry, 384(4), 539–549.

Krautz, G. M., Kissinger, J. C., & Krettli, A. U. (2000). The targets of the lytic antibody response against Trypanosoma cruzi. Parasitology Today , 16(1), 31–34.

Kumar, S., & Tarleton, R. L. (1998). The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of Trypanosoma cruzi. Parasite Immunology, 20(5), 207–216.

Kuschnir, E., Sgammini, H., Castro, R., Evequoz, C., Ledesma, R., & Brunetto, J. (1985). [Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy]. Arquivos brasileiros de cardiología, 45(4), 249–256.

Labovsky, V., Smulski, C. R., Gómez, K., Levy, G., & Levin, M. J. (2007). Anti-beta1-adrenergic receptor autoantibodies in patients with chronic Chagas heart disease. Clinical and Experimental Immunology, 148(3), 440–449.

Lasso, P., Mateus, J., Pavía, P., Rosas, F., Roa, N., Thomas, M. C., López, M. C., González, J. M., Puerta, C. J., & Cuéllar, A. (2015). Inhibitory Receptor Expression on CD8+ T Cells Is Linked to Functional Responses against Trypanosoma cruzi Antigens in Chronic Chagasic Patients. Journal of Immunology , 195(8), 3748–3758.

Laucella, S. A., Mazliah, D. P., Bertocchi, G., Álvarez, M. G., Cooley, G., Viotti, R., Albareda, M. C., Lococo, B., Postan, M., Armenti, A., & Tarleton, R. L. (2009). Changes in Trypanosoma cruzi-specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy. Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of

America, 49(11), 1675–1684.

Laucella, S. A., Postan, M., Martin, D., Hubby Fralish, B., Albareda, M. C., Álvarez, M. G., Lococo, B., Barbieri, G., Viotti, R. J., & Tarleton, R. L. (2004). Frequency of interferon- gamma -producing T cells specific for Trypanosoma cruzi inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. The Journal of Infectious Diseases, 189(5), 909–918.

Le Loup, G., Pialoux, G., & Lescure, F. X. (2011). Update in treatment of Chagas disease. Current Opinion in Infectious Diseases, 24(5), 428–434.

Lindqvist, M., van Lunzen, J., Soghoian, D. Z., Kuhl, B. D., Ranasinghe, S., Kranias, G., Flanders, M. D., Cutler, S., Yudanin, N., Muller, M. I., Davis, I., Farber, D., Hartjen, P., Haag, F., Alter, G., Schulze zur Wiesch, J., & Streeck, H. (2012). Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. The Journal of clinical investigation, 122(9), 3271–3280.

Longhi, S. A., Atienza, A., Prados, G. P., Buying, A., Balouz, V., Buscaglia, C. A., Santos, R., Tasso, L. M., Bonato, R., Chiale, P., Pinilla, C., Judkowski, V. A., & Gómez, K. A. (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. In PLoS Neglected Tropical Diseases (Vol. 8, Issue 6, p. e2906).

López Bergami, P., Scaglione, J., & Levin, M. J. (2001). Antibodies against the carboxyl-terminal end of the Trypanosoma cruzi ribosomal P proteins are pathogenic. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 15(14), 2602–2612.

Lopez, M. C. L., Pérez-Antón, E., & Carmen Thomas, M. (2019). T-cell exhaustion process during chronic infection caused by intracellular trypanosomatids. Ars Pharmaceutica, 60(2), 65–78.

Macchiaverna, N. P., Enriquez, G. F., Buscaglia, C. A., Balouz, V., Gürtler, R. E., & Cardinal, M. V. (2018). New human isolates of Trypanosoma cruzi confirm the predominance of hybrid lineages in domestic transmission cycle of the Argentinean Chaco. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 66, 229–235.

Martin, D. L., Weatherly, D. B., Laucella, S. A., Cabinian, M. A., Crim, M. T., Sullivan, S., Heiges, M., Craven, S. H., Rosenberg, C. S., Collins, M. H., Sette, A., Postan, M., & Tarleton, R. L. (2006). CD8+ T-Cell responses to Trypanosoma cruzi are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. PLoS Pathogens, 2(8), e77.

Martín-Dávila, P., Fortún, J., López-Vélez, R., Norman, F., Montes de Oca, M., Zamarrón, P., González, M. I., Moreno, A., Pumarola, T., Garrido, G., Candela, A., & Moreno, S. (2008). Transmission of tropical and geographically restricted infections during solid-organ transplantation. Clinical Microbiology Reviews, 21(1), 60–96.

Martínez, J., Campetella, O., Frasch, A. C., & Cazzulo, J. J. (1993). The reactivity of sera from chagasic patients against different fragments of cruzipain, the major cysteine proteinase from Trypanosoma cruzi, suggests the presence of defined antigenic and catalytic domains. Immunology Letters, 35(2), 191–196.

Mason, R. P., & Holtzman, J. L. (1975). The mechanism of microsomal and mitochondrial nitroreductase. Electron spin resonance evidence for nitroaromatic free radical intermediates. Biochemistry, 14(8), 1626–1632.

Masuda, M. O., Levin, M., De Oliveira, S. F., Dos Santos Costa, P. C., Bergami, P. L., Dos Santos Almeida, N. A., Pedrosa, R. C., Ferrari, I., Hoebeke, J., & Campos de Carvalho, A. C. (1998). Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by Trypanosoma cruzi antigens. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 12(14), 1551–1558.

Mazza, S., (1936). Casos crónicos de la enfermedad de Chagas determinados en Jujuy. V Congreso Argentino de Medicina. Santa Fé, Argentina: s.n., pp. 1-3.

Mazza, S., (1943). Comprobaciones de Triatoma platensis, Eutriatoma oswaldoi, Pastrongylus seai y Psamulester coreodes en la provincia de Santiago del Estero, todas ellas sobre infección por T. cruzi. Otros datos sobre infestación esquizotripanosómica natural silvestre de. Prensa Médica Argentina, vol. 30, pp. 1583-1595.

Mazza, S. (1949). La enfermedad de Chagas en la Republica Argentina. In Memórias do

Instituto Oswaldo Cruz (Vol. 47, Issues 1-2, pp. 273–302). https://doi.org/10.1590/s0074-02761949000100011

Michailowsky, V., Murta, S. M., Carvalho-Oliveira, L., Pereira, M. E., Ferreira, L. R., Brener, Z., Romanha, A. J., & Gazzinelli, R. T. (1998). Interleukin-12 enhances in vivo parasiticidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of Trypanosoma cruzi. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42(10), 2549–2556.

Ministerio de Salud de Argentina, 2018. Atención del paciente infectado con Trypanosoma cruzi . GUIA PARA EL EQUIPO DE SALUD. Atención del paciente infectado con Trypanosoma cruzi. pp. 1-96.

Minoprio, P., Burlen, O., Pereira, P., Guilbert, B., Andrade, L., Hontebeyrie-Joskowicz, M., & Coutinho, A. (1988). Most B cells in acute Trypanosoma cruzi infection lack parasite specificity. Scandinavian journal of immunology, 28(5), 553–561.

Minoprio, P., Coutinho, A., Spinella, S., & Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1991). Xid immunodeficiency imparts increased parasite clearance and resistance to pathology in experimental Chagas' disease. International Immunology, 3(5), 427–433.

Moir, S., Ho, J., Malaspina, A., Wang, W., DiPoto, A. C., O'Shea, M. A., Roby, G., Kottilil, S., Arthos, J., Proschan, M. A., Chun, T.-W., & Fauci, A. S. (2008). Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. The Journal of Experimental Medicine, 205(8), 1797–1805.

Moir, S., Malaspina, A., & Fauci, A. S. (2011). Prospects for an HIV vaccine: leading B cells down the right path. Nature structural & molecular biology, 18(12), 1317–1321.

Moir, S., & Fauci, A. S. (2013). Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. Immunological reviews, 254(1), 207–224.

Moreno, S. N., Docampo, R., Mason, R. P., Leon, W., & Stoppani, A. O. (1982). Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and Trypanosoma cruzi microsomal preparations. Archives of Biochemistry and Biophysics, 218(2), 585–591.

Morillo, C. A., Marin-Neto, J. A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A., Rosas, F., Villena, E., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., Guhl, F., Velazquez, E., Bonilla, L., Meeks, B., Rao-Melacini, P., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Rassi, A., … Yusuf, S. (2015). Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. In New England Journal of Medicine (Vol. 373, Issue 14, pp. 1295–1306).

Moscatelli, G., Moroni, S., García-Bournissen, F., Ballering, G., Bisio, M., Freilij, H., & Altcheh, J. (2015). Prevention of congenital Chagas through treatment of girls and women of childbearing age. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, 110(4), 507–509.

Motrán, C. C., Cerbán, F. M., Rivarola, W., Iosa, D., & Vottero de Cima, E. (1998). Trypanosoma cruzi: immune response and functional heart damage induced in mice by the main linear B-cell epitope of parasite ribosomal P proteins. Experimental Parasitology, 88(3), 223–230.

Murcia, L., Simón, M., Carrilero, B., Roig, M., & Segovia, M. (2017). Treatment of Infected Women of Childbearing Age Prevents Congenital Trypanosoma cruzi Infection by Eliminating the Parasitemia Detected by PCR. The Journal of Infectious Diseases, 215(9), 1452–1458.

Murphy, N., Macchiaverna, N. P., Victoria Cardinal, M., Bhattacharyya, T., Mertens, P., Zeippen, N., Gustin, Y., Gilleman, Q., Gürtler, R. E., & Miles, M. A. (2019). Lineage-specific rapid diagnostic tests can resolve Trypanosoma cruzi TcII/V/VI ecological and epidemiological associations in the Argentine Chaco. Parasites & vectors, 12(1), 424.

Natale, M. A., Cesar, G., Álvarez, M. G., Castro Eiro, M. D., Lococo, B., Bertocchi, G., Albareda, M. C., & Laucella, S. A. (2018). Trypanosoma cruzi-specific IFN-γ-producing cells in chronic Chagas disease associate with a functional IL-7/IL-7R axis. PLoS Neglected Tropical Diseases, 12(12), e0006998.

Natale, M. A., Minning, T., Albareda, M. C., Castro Eiro, M. D., Álvarez, M. G., Lococo, B., Cesar, G., Bertocchi, G., Elias, M. J., Caputo, M. B., Tarleton, R. L., & Laucella, S. A. (2021). Immune exhaustion in chronic Chagas disease: Pro-inflammatory and immunomodulatory action of IL-27 in vitro. PLoS neglected tropical diseases, 15(6), e0009473.

Nelson, A. N., Lin, W. W., Shivakoti, R., Putnam, N. E., Mangus, L., Adams, R. J., Hauer, D., Baxter, V. K., & Griffin, D. E. (2020). Association of persistent wild-type measles virus RNA with long-term humoral immunity in rhesus macaques. JCI insight, 5(3), e134992.

Niborski, L. L., Grippo, V., Lafón, S. O., Levitus, G., García-Bournissen, F., Ramirez, J. C., Burgos, J. M., Bisio, M., Juiz, N. A., Ayala, V., Coppede, M., Herrera, V., López, C., Contreras, A., Gómez, K. A., Elean, J. C., Mujica, H. D., Schijman, A. G., Levin, M. J., & Longhi, S. A. (2016). Serological based monitoring of a cohort of patients with chronic Chagas disease treated with benznidazole in a highly endemic area of northern Argentina. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, 111(6), 365–371.

Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M., & Corcoran, L. M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. Nature Reviews. Immunology, 15(3), 160–171.

Organización Mundial de la salud. (2021). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana).
https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease.

Padilla, A. M., Simpson, L. J., & Tarleton, R. L. (2009). Insufficient TLR activation contributes to the slow development of CD8+ T cell responses in Trypanosoma cruzi infection. Journal of Immunology , 183(2), 1245–1252.

Parodi, C., Barrio, A., García Bustos, M. F., González Prieto, A. G., Pimentel, J., Badano, N., Albareda, M. C., Castro Eiro, M. E., Laucella, S. A., & de Elizalde de Bracco, M. M. (2020). B-cell profile, B-cell activating factor concentration and IgG levels in human cutaneous and mucosal leishmaniasis. Parasite immunology, 42(9), e12759.

Passos, L., Magalhães, L. M. D., Soares, R. P., Marques, A. F., Alves, M. L. R., Giunchetti, R. C., Nunes, M. do C. P., Gollob, K. J., & Dutra, W. O. (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, 3015.

Pellegrini, A., Carrera-Silva, E. A., Arocena, A., Cano, R. C., Aoki, M. P., & Gea, S. (2011). Trypanosoma cruzi antigen immunization induces a higher B cell survival in BALB/c mice, a susceptible strain, compared to C57BL/6 B lymphocytes, a resistant strain to cardiac

autoimmunity. Medical Microbiology and Immunology, 200(4), 209–218.

Pérez-Antón, E., Egui, A., Thomas, M. C., Puerta, C. J., González, J. M., Cuéllar, A., Segovia, M., & López, M. C. (2018). Impact of benznidazole treatment on the functional response of Trypanosoma cruzi antigen-specific CD4+CD8+ T cells in chronic Chagas disease patients. PLoS Neglected Tropical Diseases, 12(5), e0006480.

Pérez-Antón, E., Egui, A., Thomas, M. del C., Simón, M., Segovia, M., & López López, M. C. (2020). Respuesta funcional de las células T CD8+ asociada a eficacia terapéutica en pacientes crónicos de Chagas.

Pérez-Mazliah, D., Gardner, P. J., Schweighoffer, E., McLaughlin, S., Hosking, C., Tumwine, I., Davis, R. S., Potocnik, A. J., Tybulewicz, V. L., & Langhorne, J. (2018). Plasmodium-specific atypical memory B cells are short-lived activated B cells. eLife, 7, e39800.

Piedras, J., Gutierrez, S., Reyes-Lopez, P. A., Reyes, K., Lopez-Karpovitch, X., & Monteon, V. (1997). Circulating Lymphocyte Subpopulations and Activated T and B Cells in Patients With Chagasic and Non-Chagasic Myocardiopathy. Cytometry, 30, 28–32.

Pinazo, M.-J., Muñoz, J., Posada, E., López-Chejade, P., Gállego, M., Ayala, E., del Cacho, E., Soy, D., & Gascon, J. (2010). Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54(11), 4896–4899.

Pitcovsky, T. A., Mucci, J., Álvarez, P., Leguizamón, M. S., Burrone, O., Alzari, P. M., & Campetella, O. (2001). Epitope mapping of trans-sialidase from Trypanosoma cruzi reveals the presence of several cross-reactive determinants. Infection and Immunity, 69(3), 1869–1875.

Portugal, S., Tipton, C. M., Sohn, H., Kone, Y., Wang, J., Li, S., Skinner, J., Virtaneva, K., Sturdevant, D. E., Porcella, S. F., Doumbo, O. K., Doumbo, S., Kayentao, K., Ongoiba, A., Traore, B., Sanz, I., Pierce, S. K., & Crompton, P. D. (2015). Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function. eLife, 4, e07218.

Portugal, S., Obeng-Adjei, N., Moir, S., Crompton, P. D., & Pierce, S. K. (2017). Atypical memory B cells in human chronic infectious diseases: An interim report. Cellular

immunology, 321, 18–25.

Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. The Lancet Infectious Diseases, 1(2), 92–100.

Quebrada Palacio, L. P., Fernández, E. R., Hernández-Vásquez, Y., Petray, P. B., & Postan, M. (2020). Circulating T Follicular Helper Cell Abnormalities Associated to Different Clinical Forms of Chronic Chagas Disease. Frontiers in cellular and infection microbiology, 10, 126.

Reina-San-Martín, B., Degrave, W., Rougeot, C., Cosson, A., Chamond, N., Cordeiro-Da-Silva, A., Arala-Chaves, M., Coutinho, A., & Minoprio, P. (2000). A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. Nature Medicine, 6(8), 890–897.

Reis, D. D., Jones, E. M., Tostes, S., Jr, Lopes, E. R., Gazzinelli, G., Colley, D. G., & McCurley, T. L. (1993). Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 48(5), 637–644.

Ribeiro, I., Sevcsik, A.-M., Alves, F., Diap, G., Don, R., Harhay, M. O., Chang, S., & Pecoul, B. (2009). New, improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients. PLoS Neglected Tropical Diseases, 3(7), e484.

Rojo, G., Castillo, C., Duaso, J., Liempi, A., Droguett, D., Galanti, N., Maya, J. D., López-Muñoz, R., & Kemmerling, U. (2014). Toxic and therapeutic effects of Nifurtimox and Benznidazol on Trypanosoma cruzi ex vivo infection of human placental chorionic villi explants. Acta Tropica, 132, 112–118.

Romanha, A. J., Alves, R. O., Murta, S. M. F., Silva, J. S., Ropert, C., & Gazzinelli, R. T. (2002). Experimental chemotherapy against Trypanosoma cruzi infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. The Journal of Infectious Diseases, 186(6), 823–828.

Rottenberg, M. E., Bakhiet, M., Olsson, T., Kristensson, K., Mak, T., Wigzell, H., & Orn, A. (1993). Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with Trypanosoma cruzi or Trypanosoma brucei. Infection and Immunity, 61(12), 5129–5133.

Russomando, G., de Tomassone, M. M., de Guillen, I., Acosta, N., Vera, N., Almiron, M., Candia, N., Calcena, M. F., & Figueredo, A. (1998). Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 59(3), 487–491.

Salimzadeh, L., Le Bert, N., Dutertre, C. A., Gill, U. S., Newell, E. W., Frey, C., Hung, M., Novikov, N., Fletcher, S., Kennedy, P. T., & Bertoletti, A. (2018). PD-1 blockade partially recovers dysfunctional virus-specific B cells in chronic hepatitis B infection. The Journal of clinical investigation, 128(10), 4573–4587.

Samudio, M., Montenegro-James, S., de Cabral, M., Martinez, J., Rojas de Arias, A., Woroniecky, O., & James, M. A. (1998). Differential expression of systemic cytokine profiles in Chagas' disease is associated with endemicity of Trypanosoma cruzi infections. Acta Tropica, 69(2), 89–97.

Sánchez-Valdéz, F. J., Padilla, A., Wang, W., Orr, D., & Tarleton, R. L. (2018). Spontaneous dormancy protects Trypanosoma cruzi during extended drug exposure. eLife, 7, e34039.

Sanmarco, L. M., Visconti, L. M., Eberhardt, N., Ramello, M. C., Ponce, N. E., Spitale, N. B., Vozza, M. L., Bernardi, G. A., Gea, S., Minguez, A. R., & Aoki, M. P. (2016). IL-6 Improves the Nitric Oxide-Induced Cytotoxic CD8+ T Cell Dysfunction in Human Chagas Disease. Frontiers in Immunology, 7, 626.

Sanmarco, L. M., Eberhardt, N., Bergero, G., Quebrada Palacio, L. P., Adami, P. M., Visconti, L. M., Minguez, Á. R., Hernández-Vasquez, Y., Carrera Silva, E. A., Morelli, L., Postan, M., & Aoki, M. P. (2019). Monocyte glycolysis determines CD8+ T cell functionality in human Chagas disease. JCI insight, 4(18), e123490.

Sanz, I., Wei, C., Jenks, S. A., Cashman, K. S., Tipton, C., Woodruff, M. C., Hom, J., & Lee, F. E.-H. (2019). Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. Frontiers in Immunology, 10, 2458.

Sathler-Avelar, R., Vitelli-Avelar, D. M., Massara, R. L., Borges, J. D., Lana, M., Teixeira-Carvalho, A., Dias, J. C. P., Elói-Santos, S. M., & Martins-Filho, O. A. (2006). Benznidazole

treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. Scandinavian Journal of Immunology, 64(5), 554–563.

Schijman, A. G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Mejia Jaramillo, A. M., Cura, C., Auter, F., Veron, V., Qvarnstrom, Y., Deborggraeve, S., Hijar, G., Zulantay, I., Lucero, R. H., Velazquez, E., Tellez, T., Sanchez Leon, Z., Galvão, L., Nolder, D., … Ladzins, J. (2011). International study to evaluate PCR methods for detection of Trypanosoma cruzi DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLoS Neglected Tropical Diseases, 5(1), e931.

Schmitt, N., Bentebibel, S. E., & Ueno, H. (2014). Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. Trends in immunology, 35(9), 436–442.

Schmunis, G. A., Zicker, F., Pinheiro, F., & Brandling-Bennett, D. (1998). Risk for transfusion-transmitted infectious diseases in Central and South America. Emerging Infectious Diseases, 4(1), 5–11.

Schnapp, A. R., Eickhoff, C. S., Scharfstein, J., & Hoft, D. F. (2002). Induction of B- and T-cell responses to cruzipain in the murine model of Trypanosoma cruzi infection. Microbes and Infection / Institut Pasteur, 4(8), 805–813.

Sebina, I., Cliff, J. M., Smith, S. G., Nogaro, S., Webb, E. L., Riley, E. M., Dockrell, H. M., Elliott, A. M., Hafalla, J. C., & Cose, S. (2012). Long-lived memory B-cell responses following BCG vaccination. PloS one, 7(12), e51381.

Shaw, J. M., Miller-Novak, L. K., Mohanram, V., McKinnon, K., Demberg, T., Vargas-Inchaustegui, D. A., Venzon, D., & Robert-Guroff, M. (2017). Influence of Plasma Cell Niche Factors on the Recruitment and Maintenance of IRF4hi Plasma Cells and Plasmablasts in Vaccinated, Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques with Low and High Viremia. Journal of virology, 91(4), e01727-16.

Smulski, C., Labovsky, V., Levy, G., Hontebeyrie, M., Hoebeke, J., & Levin, M. J. (2006). Structural basis of the cross-reaction between an antibody to the Trypanosoma cruzi ribosomal P2beta protein and the human beta1 adrenergic receptor. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 20(9), 1396–1406.

Somoza, M., Bertelli, A., Pratto, C. A., Verdun, R. E., Campetella, O., & Mucci, J. (2022). Trypanosoma cruzi Induces B Cells That Regulate the CD4+ T Cell Response. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11, 789373.

Sosa Estani, S., Segura, E. L., Ruiz, A. M., Velazquez, E., Porcel, B. M., & Yampotis, C. (1998). Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. The American journal of tropical medicine and hygiene, 59(4), 526–529.

Sosa-Estani, S., Cura, E., Velazquez, E., Yampotis, C., & Segura, E. L. (2009 A). Etiological treatment of young women infected with Trypanosoma cruzi, and prevention of congenital transmission. Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 42(5), 484–487.

Sosa-Estani, S., Viotti, R., & Segura, E. L. (2009 B). Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, 104 Suppl 1, 167–180.

TDR/WHO, 2012. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. WHO Technical Report Series, no. 975.

Tanowitz, H. B., Kirchhoff, L. V., Simon, D., Morris, S. A., Weiss, L. M., & Wittner, M. (1992). Chagas' disease. Clinical Microbiology Reviews, 5(4), 400–419.

Tanowitz, H. B., Huang, H., Jelicks, L. A., Chandra, M., Loredo, M. L., Weiss, L. M., Factor, S. M., Shtutin, V., Mukherjee, S., Kitsis, R. N., Christ, G. J., Wittner, M., Shirani, J., Kisanuki, Y. Y., & Yanagisawa, M. (2005). Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease. Infection and Immunity, 73(4), 2496–2503.

Tarleton, R. L., Koller, B. H., Latour, A., & Postan, M. (1992). Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to Trypanosoma cruzi infection. Nature, 356(6367), 338–340.

Tarleton, R. L., Sun, J., Zhang, L., & Postan, M. (1994). Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. Infection and Immunity, 62(5), 1820–1829.

Tarleton, R. L., Zhang, L., & Downs, M. O. (1997). “Autoimmune rejection” of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94(8), 3932–3937.

Tarleton, R. L. (2015). CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. Seminars in Immunopathology, 37(3), 233–238.

Tibayrenc, M. (1998). Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. International Journal for Parasitology, 28(1), 85–104.

Toledo, M. J. O., Machado, G. B. N., Pereira, M. E. S., & Brener, Z. (1991). Results of treatment in mice immunosuppressed inoculated with different Trypanosoma cruzi strains. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, 86, 237.

Turrens, J. F. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. Molecular Aspects of Medicine, 25(1-2), 211–220.

Uddbäck, I., Cartwright, E. K., Schøller, A. S., Wein, A. N., Hayward, S. L., Lobby, J., Takamura, S., Thomsen, A. R., Kohlmeier, J. E., & Christensen, J. P. (2021). Long-term maintenance of lung resident memory T cells is mediated by persistent antigen. Mucosal immunology, 14(1), 92–99.

Van de Wijer, L., van der Heijden, W. A., Ter Horst, R., Jaeger, M., Trypsteen, W., Rutsaert, S., van Cranenbroek, B., van Rijssen, E., Joosten, I., Joosten, L., Vandekerckhove, L., Schoofs, T., van Lunzen, J., Netea, M. G., Koenen, H., van der Ven, A., & de Mast, Q. (2021). The Architecture of Circulating Immune Cells Is Dysregulated in People Living With HIV on Long Term Antiretroviral Treatment and Relates With Markers of the HIV-1 Reservoir, Cytomegalovirus, and Microbial Translocation. Frontiers in immunology, 12, 661990.

Vernengo, F. F., Beccaria, C. G., Araujo Furlan, C. L., Boari, J. T., Almada, L., Serrán, M. G., Gazzoni, Y., Montes, C. L., Acosta Rodríguez, E. V., & Gruppi, A. (2020). CD8 T Cell Immunity Is Compromised by Anti-CD20 Treatment and Rescued by Interleukin-17A. In mBio (Vol. 11, Issue 3).

Viotti, R., Vigliano, C., Armenti, H., & Segura, E. (1994). Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. American Heart Journal, 127(1), 151–162.

Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Bertocchi, G., Petti, M., Alvarez, M. G., Postan, M., & Armenti, A. (2006). Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. Annals of internal medicine, 144(10), 724–734.

Viotti, R., Vigliano, C., Álvarez, M. G., Lococo, B., Petti, M., Bertocchi, G., Armenti, A., De Rissio, A. M., Cooley, G., Tarleton, R., & Laucella, S. (2011). Impact of aetiological treatment on conventional and multiplex serology in chronic Chagas disease. PLoS Neglected Tropical Diseases, 5(9), e1314.

Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Álvarez, M. G., Petti, M., Bertocchi, G., & Armenti, A. (2009). Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 7(2), 157–163.

Virgin, H. W., Wherry, E. J., & Ahmed, R. (2009). Redefining chronic viral infection. Cell, 138(1), 30–50.

Weiss, G. E., Crompton, P. D., Li, S., Walsh, L. A., Moir, S., Traore, B., Kayentao, K., Ongoiba, A., Doumbo, O. K., & Pierce, S. K. (2009). Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. Journal of Immunology , 183(3), 2176–2182.

Wherry, E. J., & Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. Nature Reviews. Immunology, 15(8), 486–499.

Wilkinson, S. R., & Kelly, J. M. (2003). The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. Biological Chemistry, 384(4), 517–525.

Yewdell, W. T., Smolkin, R. M., Belcheva, K. T., Mendoza, A., Michaels, A. J., Cols, M., Angeletti, D., Yewdell, J. W., & Chaudhuri, J. (2021). Temporal dynamics of persistent germinal

centers and memory B cell differentiation following respiratory virus infection. Cell reports, 37(6), 109961.

Zander, AR., & S. Butler, N. (2013). Dysfunctional Adaptive Immunity During Parasitic Infections. Current Immunology Reviews, 9(3), 179–189.

Zammit, D. J., Turner, D. L., Klonowski, K. D., Lefrançois, L., & Cauley, L. S. (2006). Residual antigen presentation after influenza virus infection affects CD8 T cell activation and migration. Immunity, 24(4), 439–449.

Zingales, B. (2018). Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. Acta Tropica, 184, 38–52.

Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., & Sturm, N. R. (2012). The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 12(2), 240–253.

Zuñiga, E., Rabinovich, G. A., Iglesias, M. M., & Gruppi, A. (2001). Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. Journal of Leukocyte Biology, 70(1), 73–79.

Zuñiga, E., Motran, C. C., Montes, C. L., Yagita, H., & Gruppi, A. (2002). Trypanosoma cruzi infection selectively renders parasite-specific IgG+ B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide. Journal of Immunology , 168(8), 3965–3973.

Zuniga, E., Acosta-Rodriguez, E., Merino, M. C., Montes, C., & Gruppi, A. (2005). Depletion of immature B cells duringTrypanosoma cruzi infection: involvement of myeloid cells and the cyclooxygenase pathway. In European Journal of Immunology (Vol. 35, Issue 6, pp. 1849–1858).

ABREVIATURAS

7. ABREVIATURAS

ANOVA Análisis de la varianza

APC Célula presentadora de antígeno profesional

APRIL Ligando inductor de la proliferación A (del inglés, proliferation inducing ligand)

BAFF Factor activador de la familia TNF (del inglés *B* cell activating factor belonging to the TNF family)

BCR Receptor de células B (del inglés B cell receptor)

CBA Matriz de perlas por citometría de flujo (del inglés, Cytometric Bead Array, CBA)

CMH Complejo mayor de histocompatibilidad

CMPs Células mononucleares de sangre periférica (del inglés, peripheral blood mononuclear cells)

CSAs Células secretoras de anticuerpos

CXCR Receptores de citocinas

DAMP Patrones moleculares asociados al daño celular (del inglés damage-associated molecular patterns)

DMSO dimetil sulfóxido

DTU Unidad discreta de tipificación (del inglés, discrete typing unit)

ECG Ecocardiograma

ELISA Análisis por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés,
enzime-linked immunosorbent assay)

ELISPOT Análisis de motas por inmunoabsorción unida a enzimas (del inglés, enzime-linked immunosorbent spot).

FAS Receptor de superficie que media la muerte celular por apoptosis, CD95

FASL Ligando para el receptor FAS

FCRL4 Proteína 4 similar al receptor Fc (del inglés, Fc receptor-like protein 4)

FSC Detector de dispersión frontal (del inglés, Forward Scatter)

FV510 Del inglés, fixable viability 510

HAI Hemaglutinación indirecta

IHQ Inmunohistoquímica

IFN-γ Interferón gamma

HLA Antígeno leucocitario humano

IFI Inmunofluorescencia indirecta

Ig Inmunoglobulina

IL Interleucina

LPS Lipopolisacárido

MFI Intensidad media de fluorescencia (del inglés, mean fluorescense intensity)

MIP-1β Proteína inflamatoria de macrófagos (del inglés, macrophage inflammatory protein)

PAMP Patrones moleculares asociados a patógenos

PBS Solución de sales de fosfato reguladora de pH (del inglés, phosphate buffered saline)

PFA paraformaldehído

PMA Del inglés, Phorbol 12-myristate 13-acetate

PRR Receptores de reconocimiento de patrones

ROS Especies reactivas de oxígeno (del inglés, reactive oxygen species)

Rx Radiografía de tórax

SEB Enterotoxina B de Staphylococcus

SFB Suero fetal bovino

SSC Detector de dispersión lateral (del inglés, Side Scatter)

TCR Receptor de linfocito T

TLR Receptores del tipo Toll (del inglés, Toll like receptor)

TNF Factor de necrosis tumoral (del inglés, tumor necrosis factor)

T. *cruzi* Trypanosoma cruzi

VIH Virus de inmunodeficiencia humana

VHC Virus de hepatitis C