



Fernández, Esteban Rodrigo

Rol de la respuesta inmune específica contra el *Trypanosoma cruzi* y la progresión de la enfermedad cardíaca en pacientes chagásicos crónicos



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Fernández, E. R. (2014). *Rol de la respuesta inmune específica contra el Trypanosoma cruzi y la progresión de la enfermedad cardíaca en pacientes chagásicos crónicos. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/586>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Rol de la respuesta inmune específica contra el Trypanosoma cruzi y la progresión de la enfermedad cardíaca en pacientes chagásicos crónicos

Role of the specific immune response against Trypanosoma cruzi and progression of heart disease in chronic chagasic patients

TESIS DOCTORAL

Esteban Rodrigo Fernández

este.fernandez@gmail.com

Resumen

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito protozoario intracelular Trypanosoma cruzi, afecta aproximadamente a 10 millones de personas. Se estima que alrededor del 20 al 30% de los individuos con infección crónica progresan hacia la miocardiopatía luego de un período asintomático de variable duración, siendo la cardiopatía chagásica la causa más frecuente de cardiomiopatía infecciosa en áreas endémicas con transmisión activa.

En la infección crónica por Trypanosoma cruzi humana se han descrito numerosas anormalidades del compartimiento celular T de sangre periférica, las cuales han sido relacionadas con estimulación antigénica prolongada asociada a persistencia parasitaria. En este trabajo, hemos evaluado el fenotipo de los linfocitos circulantes en base a la expresión de CD19, CD4, CD27, CD10, IgD, IgM, IgG y CD138 en un total de 48 individuos infectados por T. cruzi y en 24 controles sanos. En los individuos infectados se observó una disminución de la frecuencia de células CD19+CD27+, que se correlacionó positivamente con la frecuencia de células CD4+CD27+. La contracción de las células CD19+CD27+ involucra las células B de memoria IgG+IgD-, IgM+IgD- y con cambio de isotipo IgM-IgD-, células B precursoras CD19+CD10+CD27+ y células plasmáticas totalmente diferenciadas CD19+CD27+CD138+. En cambio, las células B de memoria CD19+IgG+CD27-IgDy transicionales/virgenes CD19+IgM+CD27+IgD- aumentan en los individuos infectados. Estas observaciones nos llevaron a determinar los niveles séricos de CD27 soluble, molécula generada por escisión de la molécula CD27 unida a la membrana, frecuentemente utilizada para establecer la activación inmune sistémica. Los niveles séricos de CD27 soluble aumentan en individuos infectados con cardiomiopatía chagásica, indicando su potencialidad como marcador inmunológico de progresión de la enfermedad cardíaca en áreas endémicas.

Para evaluar el estado de activación de las células B circulantes e interacción con las células T colaboradoras que promueven el desarrollo de células B de memoria de larga vida y diferenciación a células plasmáticas, se determinó la expresión de diferentes marcadores de activación y moléculas de co-señalización en células B y T circulantes. En los individuos asintomáticos se detectó aumento de la proporción de células CD19+CD40+ y niveles de intensidad de fluorescencia media de CD70 y CD154 en los linfocitos T CD4+. En conjunto, estas observaciones sugieren un fenómeno de desregulación a nivel de co-señalización celular B-T.

La estimulación de PBMC con Ag T. cruzi o un cóctel de citoquinas in vitro (para inducir la proliferación y diferenciación de células B de memoria a células plasmáticas) fue ineficiente para inducir una respuesta de anticuerpos IgG específica para T. cruzi significativa. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la mayoría de las células B de sangre periférica no son específicas contra el parásito propuesta por otros autores.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la infección crónica por T. cruzi altera la distribución de varias subpoblaciones de células B circulantes en sangre periférica, probablemente relacionada con un proceso de desregulación de las células T CD4+ provocado por el parásito y que las células B de memoria circulantes no son competentes para generar una respuesta IgG específica sustancial contra el parásito.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas crónica, Trypanosoma cruzi, células B, células B de memoria, CD27 soluble

Abstract

Chagas disease, caused by the intracellular protozoan parasite Trypanosoma cruzi, affects approximately 10 million people. An estimated 20 to 30% of chronically infected subjects show progression to cardiomyopathy, following an asymptomatic period of years to decades. Chagas heart disease is the most frequent cause of infectious cardiomyopathy in endemic areas of T. cruzi active transmission.

Numerous abnormalities of the peripheral blood T cell compartment have been reported in human chronic Trypanosoma cruzi infection and related to prolonged antigenic stimulation by persisting parasites. Herein, we measured circulating lymphocytes of various phenotypes based on the differential expression of CD19, CD4, CD27, CD10, IgD, IgM, IgG and CD138 in a total of 48 T. cruzi-infected individuals and 24 healthy controls. Infected individuals had decreased frequencies of CD19+CD27+ cells, which positively correlated with the frequencies of CD4+CD27+ cells. The contraction of CD19+CD27+ cells was comprised of IgG+IgD-, IgM+IgD- and isotype switched IgM-IgD- memory B cells, CD19+CD10+CD27+ B cell precursors and terminally differentiated CD19+CD27+CD138+ plasma cells. Conversely, infected individuals had increased proportions of CD19+IgG+CD27-IgD- memory and CD19+IgM+CD27-IgD+ transitional/naïve B cells. These observations prompted us to assess soluble CD27, a molecule generated by cleavage of membranebound CD27 and used to monitor systemic immune activation. Elevated levels of serum soluble CD27 were observed in infected individuals with Chagas cardiomyopathy, indicating its potentiality as an immunological marker for disease progression in endemic areas.

To address the activation status of circulating B cells and cognate helper T cell-B cell interactions that promote the development of long-lived memory B cells and differentiation to plasma cells, we examined the expression of several activation markers and co-signaling molecules on circulating B cells and T cells. The asymptomatic individuals had increased proportion of CD19+CD40+ B cells and higher mean fluorescence intensity of CD70 and CD154 by T CD4+ cells, suggesting a deregulation phenomenon at the level of B-T cell co-signalization.

In vitro stimulation of PBMC with a T. cruzi lysate or a cytokine cocktail (to allow the existing memory B cells to proliferate and differentiate to plasma cells) was inefficient to elicit a significant parasite-specific IgG antibody response, supporting the hypothesis that most of the peripheral blood B cells are not specific against the parasite proposed by other authors.

In conclusion, our results demonstrate that chronic T. cruzi infection alters the distribution of various peripheral blood B cell subsets, probably related to the CD4+ T cell deregulation process provoked by the parasite in humans and the persisting memory B cells are not competent to generate a substantial T. cruzi-specific IgG response.

Key words: Chronic Chagas disease, Trypanosoma cruzi, B cells, memory B cells, soluble CD27.

Directora de tesis: Dra. Miriam Postan

Co-Director de tesis: Dra. Graciela Almallo de Glikmann

Lugar de trabajo: Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chabén", Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

AGRADECIMIENTOS

A Miriam Postan por haber brindado su esfuerzo y ayuda.

A Mariela, Carina y Luz por ayudar, escuchar, aconsejar y hacer posible este trabajo.

A Yolanda Hernandez-Vasquez, Oscar Ledesma, Maria Lucrecia Morán y Natalia Sirena por su calidad humana y por su compromiso con los pacientes.

A Rafael Arguello, Patricia Bustos, Alina Perrone, Bibiana Volta, Maximiliano Ferrer y Débora González por estar siempre ahí alentándome y ayudándome a progresar como persona, amigo y profesional.

A Gaelle, por esperarme y aguantarme en los momentos difíciles.

A todos los/las “inmunocenos”, con los cuales creamos un lugar para compartir nuestros pequeños conocimientos y gran interés por el desarrollo científico en el campo de la inmunología.

A Juan, Pato G, Andrea, Rocío, Dani, Cris, Pato G y todos mis amigos del Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chabén” por su cariño y apoyo.

A mis amigos de la vida, por estar siempre ahí, por su afecto, atención y hasta de su propia sangre para que pueda realizar este trabajo.

A todos los pacientes que donaron su sangre para que esta investigación sea posible. Gracias a la ciencia por mantener siempre encendida mi curiosidad y el placer de descubrir.

A mis padres y hermana,

A mi abuelos y a mis amigos,

*“En el fondo, los científicos somos gente con suerte:
podemos jugar a lo que queremos durante toda la vida”*

L. Smolin

INDICE

1.	INTRODUCCION	1
1.1.	Generalidades de la enfermedad de Chagas.....	1
1.2.	Epidemiología, distribución geográfica y vías de transmisión	4
1.3.	Agente etiológico y ciclo de vida	6
1.4.	Diagnóstico de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
1.5.	Tratamiento etiológico de la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
1.6.	Respuesta inmune en la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
2.	OBJETIVOS	26
2.1.	Objetivo general	26
2.2.	Objetivos específicos	26
3.	MATERIALES Y METODOS.....	28
3.1.	Diseño experimental	28
3.2.	Diagnóstico serológico	28
3.3.	Características de la población estudiada	29
3.4.	Aislamiento de células mononucleares de sangre periféricas (PBMC) y citometría de flujo.....	30
3.5.	Determinación del número absoluto de linfocitos	31
3.6.	Determinación de la función secretora de IgG in vitro	31
3.7.	Determinación del perfil isotípico de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específica para <i>T. cruzi</i>	32
3.8.	Determinación de los niveles de sCD27	34
3.9.	Cultivo de parásitos, preparación de homogenato y de una suspensión enriquecida en proteínas derivadas de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
3.10.	Análisis Estadístico	35
4.	RESULTADOS.....	38
4.1.	Caracterización fenotípica de la población de linfocitos B en PBMC de individuos con enfermedad de Chagas crónica.....	38
4.2.	Cambios en el porcentaje de las principales subpoblaciones de linfocitos B circulantes en sangre periférica.	38
4.3.	Linfocitos B de memoria.....	40

4.4.	Análisis de la subpoblación de células B IgM+CD27+IgD+ en la infección crónica por <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
4.5.	Efecto de la infección crónica por <i>Trypanosoma cruzi</i> sobre las células B vírgenes.....	45
4.6.	Reducción de las células plasmáticas terminalmente diferenciadas en infección crónica por <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
4.7.	Linfocitos B inmaduros/transicionales en la infección crónica por <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
4.8.	Distribución de subpoblaciones de células B en relación al estadio de la enfermedad de Chagas crónica.....	48
4.9.	Análisis de linfocitos T CD4+ en la infección crónica por <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
4.10.	Niveles séricos de CD27 soluble en individuos con enfermedad de Chagas crónica.	51
4.11.	Impacto de la infección crónica sobre la expresión de marcadores de co-señalización y activación en células CD19+ y CD4+ de sangre periférica.....	53
4.12.	Funcionalidad de los linfocitos B de sangre periférica en los individuos con la enfermedad de Chagas crónica.....	59
4.13.	Perfil de isotipo de IgG sérica en individuos con enfermedad de Chagas crónica.	62
5.	DISCUSION.....	65
6.	CONCLUSION	85
7.	REFERENCIAS	88
8.	ABREVIATURAS	105
9.	ANEXO	106
9.1.	Producción científica	106

INTRODUCCION

1.INTRODUCCION

1.1.Generalidades de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una zoonosis cuyo agente causal el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* es transmitido en la naturaleza por un agente vector hematófago o por vía transplacentaria. Tanto la enfermedad, como el agente etiológico y el vector fueron descritos por Carlos Chagas en 1909 en Minas Gerais, Brasil. La enfermedad de Chagas en el ser humano comprende 2 etapas o fases evolutivas, aguda y crónica, separadas por un período clínicamente “silencioso” de variable duración denominado fase indeterminada, asintomática, inaparente o de infección subclínica (Laranja FS y col., 1956; Rosenbaum MB y col., 1964; Kirchoff LV, 2011). En la etapa aguda se pueden observar signos a nivel de la puerta de entrada del parásito, más frecuentemente en la región periocular, con edema palpebral unilateral acompañado de adenomegalias regionales (chagoma de inoculación o signo de Romaña). También puede observarse fiebre, temblores, vómitos, hepatoesplenomegalia y diarrea durante esta etapa. Aproximadamente 5% de las personas infectadas, generalmente niños o adultos inmunosuprimidos, presentan un cuadro infeccioso agudo generalizado, con miocarditis y/o meningoencefalitis, que en los casos más severos puede ser letal. Sin embargo, en la mayoría de los individuos afectados la infección transcurre en forma asintomática y es eventualmente diagnosticada años más tarde, durante el embarazo o en estudios epidemiológicos. La etapa aguda de la infección cursa con altos niveles de parasitemia que disminuyen progresivamente luego del desarrollo de la respuesta inmune humoral o como resultado del tratamiento específico. El tratamiento con los medicamentos parasiticidas tradicionales benznidazol y nifurtimox es altamente efectivo para la eliminación de los parásitos y curación de la infección durante la etapa aguda. En los casos de fallo terapéutico o en personas infectadas no tratadas, la infección entra en una etapa clínicamente silenciosa durante la cual los parásitos circulantes dejan de ser detectables por métodos directos. La mayoría de los individuos infectados permanecen asintomáticos, y la infección es sospechada por los antecedentes

epidemiológicos y se diagnostica por métodos de laboratorio indirectos. Aproximadamente el 30% de los individuos infectados desarrolla manifestaciones cardíacas y/o digestivas progresivas e irreversibles, características de la etapa crónica sintomática de la infección, luego de un período de tiempo variable de 10 a 30 años de duración (Laranja FS y col., 1956; Rosenbaum MB y col., 1964; Kirchhoff LV, 2011).

El compromiso cardíaco es la manifestación más frecuente y de mayor importancia en la etapa crónica de la enfermedad en Argentina (Figura 1) (Mazza S y col., 1949; Rosenbaum MB y Cerisola JA, 1961). Algunos individuos tienen defectos de conducción eléctrica, alteraciones del ritmo cardíaco y anormalidades segmentarias de motilidad de la pared cardíaca, mientras que otros desarrollan síntomas severos de insuficiencia cardíaca y fenómenos tromboembólicos. Los pacientes son agrupados en base al desarrollo de alteraciones del sistema de conducción eléctrica, hipertrofia e insuficiencia cardíaca según las clasificaciones de Kuschnir y col., y de la “New York Heart Association (Kuschnir E., y col, 1985; Criteria Committee of the New York Heart Association, 1964). La clasificación de Kuschnir es la más difundida en nuestro país, y separa los individuos infectados de acuerdo a los hallazgos electrocardiográficos, ecocardiográficos y por radiografía de tórax en 4 grupos:

- Grupo 0 (G0): pacientes asintomáticos, con electrocardiograma (ECG) y radiografía de tórax (Rx) normales.
- Grupo 1 (G1): pacientes con alteraciones ECG leves (por ej. Bloqueo de rama derecha, hemibloqueo anterior o posterior, extrasístoles ventriculares polifocales o con formas repetitivas, taquicardia sostenida y/o fibrilación ventricular) y Rx normal.
- Grupo 2 (G2): pacientes con alteraciones ECG más severas (por ej. Bloqueo aurículo-ventricular de 2^{do} y 3^{er} Grado y depresión marcada del nódulo sinusal) y cardiomegalia en la Rx y/o ecocardiograma.

- Grupo 3 (G3): pacientes con alteraciones ECG severas, cardiomegalia y signos clínicos, radiológicos y ecocardiográficos de insuficiencia cardíaca, con evidencias de lesión miocárdica.

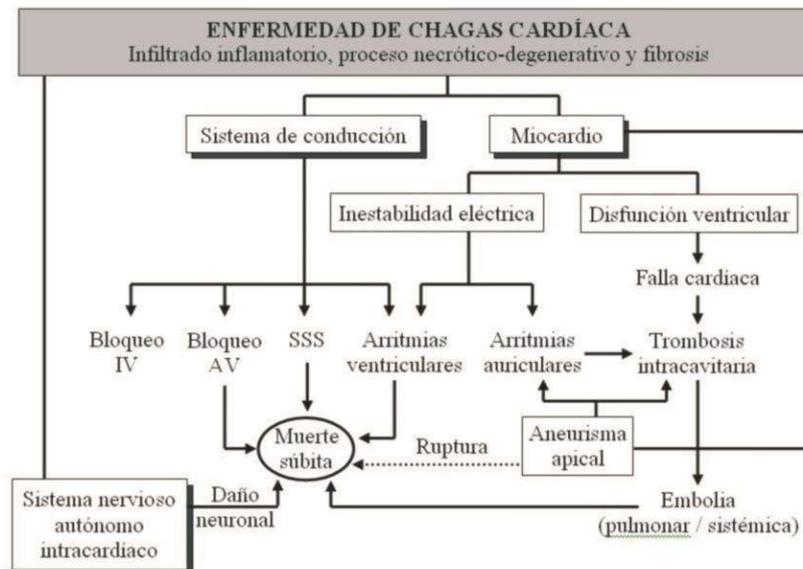


Figura 1. Esquema general de la enfermedad de Chagas cardíaca, adaptado de Rassi A JR y col., 2000. IV: intraventricular, AU: aurículo-ventricular, SSS: síndrome sinusal.

La causa de muerte más frecuente en los pacientes con infección crónica por *T. cruzi* es la muerte súbita (aprox. 55 a 65%). Otras causas de muerte incluyen la insuficiencia cardíaca congestiva (aprox. 25 to 30%) y embolismo cerebral y/o pulmonar (aprox. 10 a 15%). La muerte súbita predomina en los pacientes con arritmias ventriculares en ausencia de compromiso cardíaco severo, mientras que el principal mecanismo de muerte en los pacientes con compromiso miocárdico severo es la insuficiencia cardíaca congestiva (Rassi A JR y col., 2000).

Otra complicación frecuente de la infección crónica es la disfunción gastrointestinal (megaesófago y/o megacolon) que se manifiesta en 5-20% de los pacientes con o sin miocardiopatía. El megaesófago produce síntomas de disfagia, odinofagia, dolor epigástrico, regurgitación, y malnutrición en los casos más severos. El megacolon se manifiesta principalmente por una constipación pertinaz que no cede al tratamiento. El análisis histopatológico de biopsias y necropsias

de pacientes con megaesófago y megacolon de origen chagásico han demostrado claramente la relación de las manifestaciones clínicas digestivas con una marcada disminución del número de neuronas en los plexos nerviosos autonómicos de Auerbach a nivel de los segmentos digestivos afectados (Köberle F, 1970). También se han descrito alteraciones de tipo neurológico, atribuibles a trastornos del sistema nervioso periférico (Sica RE y col., 1986; Gonzalez Cappa SM y col., 1987; Losavio A y col., 1989).

1.2.Epidemiología, distribución geográfica y vías de transmisión

La transmisión de *T. cruzi* en la naturaleza está estrechamente relacionada con la distribución de triatomíneos, distribuidos en zonas rurales desde el sur de Estados Unidos hasta la Patagonia Argentina. Sin embargo, las frecuentes corrientes migratorias han extendido la transmisión por otras vías de infección a centros urbanos y países libres de vectores. De acuerdo a lo estimado por la Organización Panamericana de la Salud (Schofield CJ y col., 2006) y la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente entre 7.7 a 10 millones de personas están infectadas con *T. cruzi*, ocasionando 10-14 mil muertes por año, y con otros 25 millones de personas en situación de riesgo en América Latina (OMS 2014).

En la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas intervienen diversos factores geográficos, socioeconómicos y culturales que determinan el tipo de vivienda y su relación con el ecosistema, y favorecen la colonización domiciliaria del vector y la vulnerabilidad de las comunidades rurales en riesgo de infección. Los datos epidemiológicos de nuestro país indican que aproximadamente 1.6 millones de habitantes estarían infectados con *T. cruzi* y que 7.3 millones están expuestos al mismo, con prevalencia e incidencia de infección variables, relacionadas con la distribución del vector en las diferentes áreas geográficas (OPS, 2006). El riesgo de infección en la distintas provincias ha sido estratificado en zonas de alto, mediano y bajo riesgo en base al índice de infección humana, la infestación domiciliaria, la mortalidad general por enfermedad e indicadores socio-económicos (INCOSUR, 2002, Figura 2).

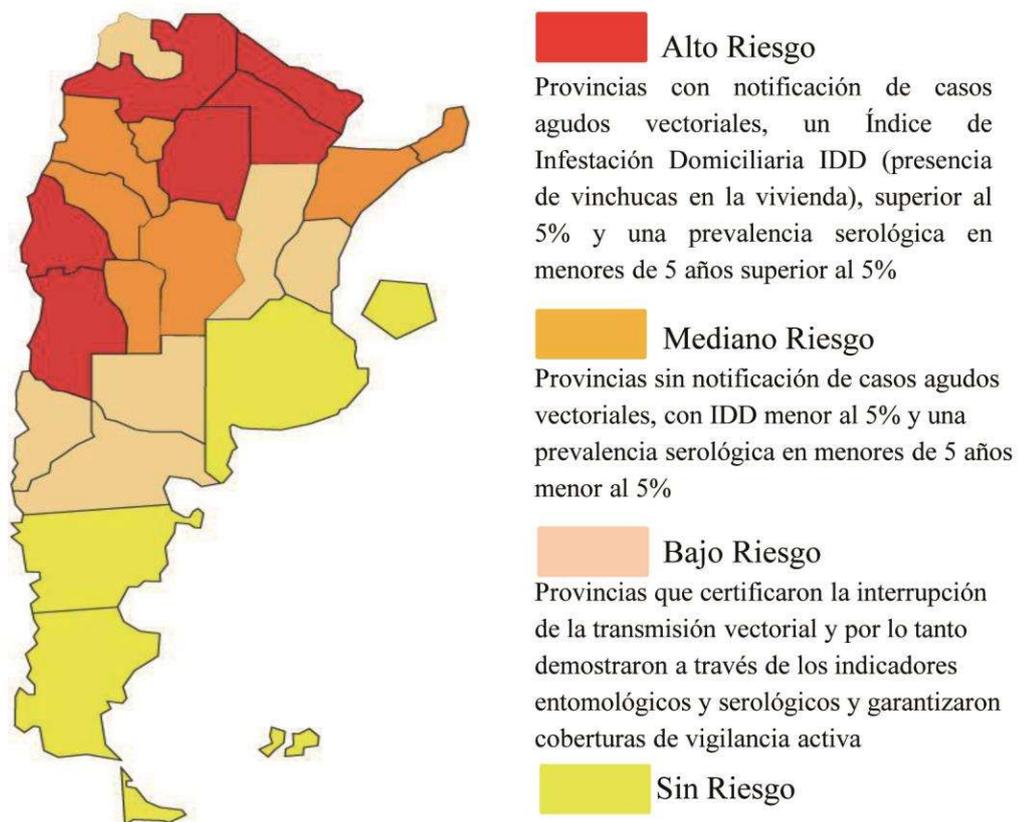


Figura 2. Mapa de riesgo de infección por *T. cruzi* en Argentina año 2012. Fuente: Programa Nacional de Chagas 2012, Ministerio de Salud de la Nación.

La infección congénita es considerada actualmente la forma más importante de transmisión de *T. cruzi* en áreas urbanas. En nuestro país existe legislación vigente que determina la obligatoriedad del diagnóstico serológico de enfermedad de Chagas en todas las mujeres embarazadas, y la evaluación del recién nacido hijo de madre seropositiva para el diagnóstico de la infección y tratamiento precoz (Ley de Pesquisa Neonatal, N°26.279/2007). Se estima que el 9% de las mujeres embarazadas están infectadas con el parásito (Blanco SB y col., 1999), y que aproximadamente el 10% de éstas transmiten la infección a sus hijos, porcentaje que varía en las diferentes áreas geográficas, y según la metodología empleada para el diagnóstico (de Rissio AM y col., 2009).

La infección puede ser también adquirida accidentalmente por la ingestión de alimentos o líquidos contaminados con el parásito, transfusión de sangre o trasplante de órganos o tejidos de individuos

donantes infectados, y menos frecuentemente por accidentes de laboratorio en personas que trabajan con parásitos vivos.

1.3. Agente etiológico y ciclo de vida

El *T. cruzi* es un parásito intracelular obligado del filo Sarcomastigofora, sub-filo Mastigofora, orden Kinetoplastide, familia Trypanosomatidea, cuyo ciclo de vida alterna entre un huésped intermediario invertebrado, el insecto triatomineo hematófago perteneciente a la familia Reduviidae, y un huésped definitivo vertebrado (Figura 3).

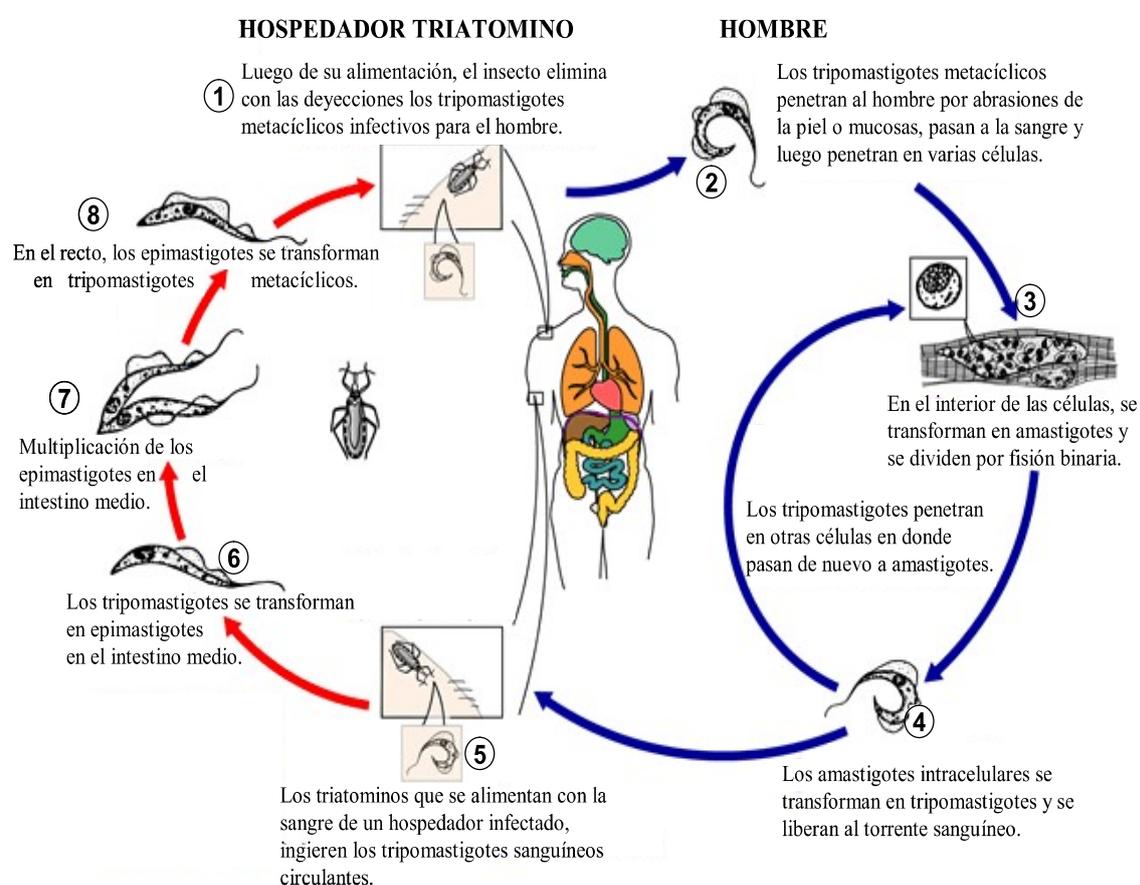


Figura 3. Esquema del ciclo de vida de *T. cruzi*, adaptado de CDC, www.dpd.cdc.gov/dpdx

La transmisión vectorial de la infección del huésped mamífero ocurre cuando el insecto deposita deyecciones contaminadas con tripomastigotes metacíclicos durante su alimentación sobre la superficie del mamífero, los cuales son interiorizados mediante el rascado o penetran activamente a través de las mucosas (1). Los parásitos metacíclicos invaden las células o son captados por

macrófagos cercanos al sitio de inoculación, diferenciándose a la forma amastigote dentro del citoplasma (2,3). Los amastigotes se multiplican por fisión binaria y se diferencian a tripomastigotes en el interior de la célula, los cuales son liberados al romperse la misma, ganando acceso a la circulación sanguínea y linfática (4). Los tripomastigotes circulantes no tienen capacidad multiplicativa, pero pueden invadir nuevas células ó ser captados por otro insecto vector durante la alimentación (5). Una vez ingeridos por el vector, los tripomastigotes sanguíneos se transforman en epimastigotes y se multiplican por división binaria en el intestino medio del insecto (6,7). Los epimastigotes pasan al intestino posterior, en donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, completándose de esta manera el ciclo natural del parásito (8) (Figura 3).

1.4. Diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*

Durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, los altos niveles de parásitos circulantes en sangre periférica permiten el diagnóstico directo mediante la observación al microscopio óptico de los tripomastigotes sanguíneos móviles en sangre fresca. Estos también pueden ser observados en frotis de sangre teñidos con Giemsa. Cuando los niveles de parasitemia son bajos, se utilizan métodos de concentración como el Strout o el microhematocrito. El diagnóstico parasitológico también puede realizarse mediante técnicas indirectas, como el xenodiagnóstico y hemocultivo, que permiten la multiplicación del parásito en el insecto vector o in vitro. Sin embargo, la sensibilidad de estos métodos depende de los niveles de parasitemia, obteniéndose mayor sensibilidad durante la fase aguda de la infección. Actualmente se encuentra en desarrollo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite amplificar secuencias de ADN específicas del parásito a partir de muestras provenientes de sangre periférica, tejidos, o preparados histológicos. Si bien la sensibilidad de esta técnica es mayor en comparación al xenodiagnóstico y hemocultivo, también depende de la densidad parasitaria, siendo de mayor utilidad para la infección aguda y congénita en relación a los casos crónicos (Tanowitz HB y col., 2009; OMS, 2002).

En los casos en que la presencia del parásito no sea detectable por los métodos parasitológicos se

han desarrollado técnicas serológicas indirectas, la mayoría de las cuales han sido validadas en nuestro país y a nivel internacional, por lo actualmente son consideradas como técnicas convencionales de rutina. Las 3 técnicas más frecuentemente utilizadas son: hemoaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). La Organización Mundial de la Salud recomienda el uso de 2 técnicas serológicas para diagnóstico de casos clínicos sospechosos de infección por *T. cruzi*. Si no se logra concordancia entre las dos técnicas, se recomienda la inclusión de una tercer técnica, que puede ser convencional o no, para definir el diagnóstico. El Ministerio de Salud argentino recomienda la utilización de 2 técnicas serológicas (ELISA y HAI) para detección de infección en embarazadas y tamizaje de la sangre a transfundir (Ministerio de Salud, Argentina, Res. Min. N° 523/97). Con el objetivo de aumentar la especificidad del diagnóstico serológico y evitar la reactividad cruzada con otras enfermedades parasitarias como leishmaniasis, se desarrollaron técnicas alternativas no convencionales utilizando proteínas recombinantes, antígenos purificados o péptidos sintéticos específicos de *T. cruzi*, con mayor especificidad en comparación a las técnicas convencionales, aunque con menor sensibilidad (Araujo FG y col., 1986; Malchiodi EL y col., 1994; OMS, 2002).

1.5. Tratamiento etiológico de la infección por *Trypanosoma cruzi*

A pesar del tiempo transcurrido desde el descubrimiento de la enfermedad de Chagas, aún no se dispone de una quimioterapia eficaz para el tratamiento de la misma. Desde 1930 se han investigado una gran cantidad de compuestos, pero los únicos que superaron la etapa clínica fueron el nifurtimox y el benznidazol (Boainain E y Rassi A, 1979), que generan radicales libres y metabolitos reducidos del grupo nitro letales para el *T. cruzi*. Ambas drogas reducen las concentraciones de glutatión, tripanotiona y glutatiónil espermidina en el parásito, moléculas involucradas en el mantenimiento del equilibrio redox intracelular de tripanosomátidos (Maya JD y col., 1997). Tanto el nifurtimox como el benznidazol son eficaces para controlar la multiplicación parasitaria y seroconversión negativa durante la etapa aguda de la infección (Russomando G y col., 1998; Rassi A y col., 2000;

Bern C y col., 2007; Altcheh J y col., 2011; de Andrade JP y col., 2011). Sin embargo, se han descrito numerosos casos de falla terapéutica relacionados con el desarrollo de resistencia de la cepa de *T. cruzi* infectante (Stoppani A y col., 1999). Por otro lado, estos compuestos también poseen la desventaja de provocar efectos adversos que frecuentemente determinan la interrupción del tratamiento.

Durante mucho tiempo se cuestionó la eficacia del tratamiento tripanocida en pacientes en la etapa crónica de la infección. Ensayos clínicos aleatorizados controlados por placebo han mostrado que los niños toleran tratamientos más prolongados con benznidazol, alcanzando seroconversión negativa en aproximadamente 60% de los casos (de Andrade AL y col., 1996; Sosa Estani S y col., 1998; Sosa Estani S y Segura EL, 1999; Altcheh J y col., 2011; de Andrade JP y col., 2011). Si bien existen evidencias clínicas, serológicas y parasitológicas que demuestran beneficios del tratamiento etiológico en adultos crónicamente infectados con el parásito (Cerisola JA y col., 1977; Viotti R y col., 1994, 2006; Fabbro DL y col., 2007; de Andrade JP y col., 2011; Perez-Mazliah DE y col., 2013), la normativa actual del Ministerio de Salud de Argentina recomienda el tratamiento etiológico en la infección aguda, niños en fase crónica de la enfermedad menores de 14 años y donante/receptor de trasplante de órgano infectado (MSAS, 2006).

En la actualidad se están llevando a cabo diferentes ensayos clínicos doble ciego aleatorizados controlados por placebo para evaluar la eficacia terapéutica del benznidazol en pacientes en la fase crónica de Chagas. El BENEFIT (Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis) es un estudio multicéntrico llevado a cabo por los Institutos de Investigación en Salud de Canadá en colaboración con la Organización Mundial de la Salud y numerosos investigadores de América Latina que involucra 3000 pacientes con enfermedad de Chagas crónica con alteraciones cardíacas preexistentes (Marin-Neto JA y col., 2008). En el INP “Dr. Mario Fatala Chaben” se realiza el proyecto TRAENA (Tratamiento etiológico con benznidazol en pacientes Adultos con enfermedad de Chagas crónica) que involucra 750 pacientes con enfermedad de Chagas crónica en diferentes

estadios clínicos, cuyos resultados preliminares indican la eficacia del tratamiento en cuanto a la seroconversión negativa de los pacientes (Riarte A, 2013).

1.6. Respuesta inmune en la infección por *Trypanosoma cruzi*

En respuesta a la infección por *T. cruzi*, el sistema inmune genera mecanismos de defensa en el huésped que logran controlar el crecimiento parasitario y resolver los signos y síntomas clínicos de la etapa aguda de la enfermedad, estableciéndose un equilibrio con el parásito que conduce a la cronicidad de la misma. En el mamífero, el *T. cruzi* circula en sangre periférica y se replica en el interior de las células infectadas. Por lo tanto el control inmunológico requiere la participación de la respuesta inmune innata y adaptativa, las cuales se activan durante la infección temprana, e involucran macrófagos, células dendríticas, linfocitos NK, B y T, y la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ , TNF- α e IL-12 (Kierszenbaum F y col., 1974 y 1976; Rottenberg M y col., 1988; Tarleton RL y col., 2007; Medzhitov R y col., 2007; Yamamoto M y col., 2010) (Figura 4). Se han realizado numerosos estudios con el objetivo de analizar el rol de estos diferentes tipos celulares en el control de la infección por *T. cruzi* y desarrollo de la enfermedad de Chagas crónica, cuyos resultados no siempre fueron coincidentes.

Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata proporciona las primeras líneas de defensa frente a los microorganismos y es capaz de responder rápidamente frente a una infección. Los principales componentes de la respuesta innata son: a) barreras físicas y químicas, como por ejemplo el epitelio y sustancias microbicidas sobre por la superficie epitelial, b) células fagocíticas, como por ejemplo los neutrófilos, macrófagos, y células NK c) anticuerpos, componentes del sistema de complemento y otros mediadores inflamatorios circulante d) citoquinas pro-inflamatorias, que regulan y coordinan varias de las actividades de las células del sistema innato. Los mecanismos de la inmunidad innata son dirigidos a estructuras comunes a grupos de microorganismos relacionados, sin capacidad para distinguir diferencias sutiles entre las diferentes sustancias “extrañas”. Estas estructuras son

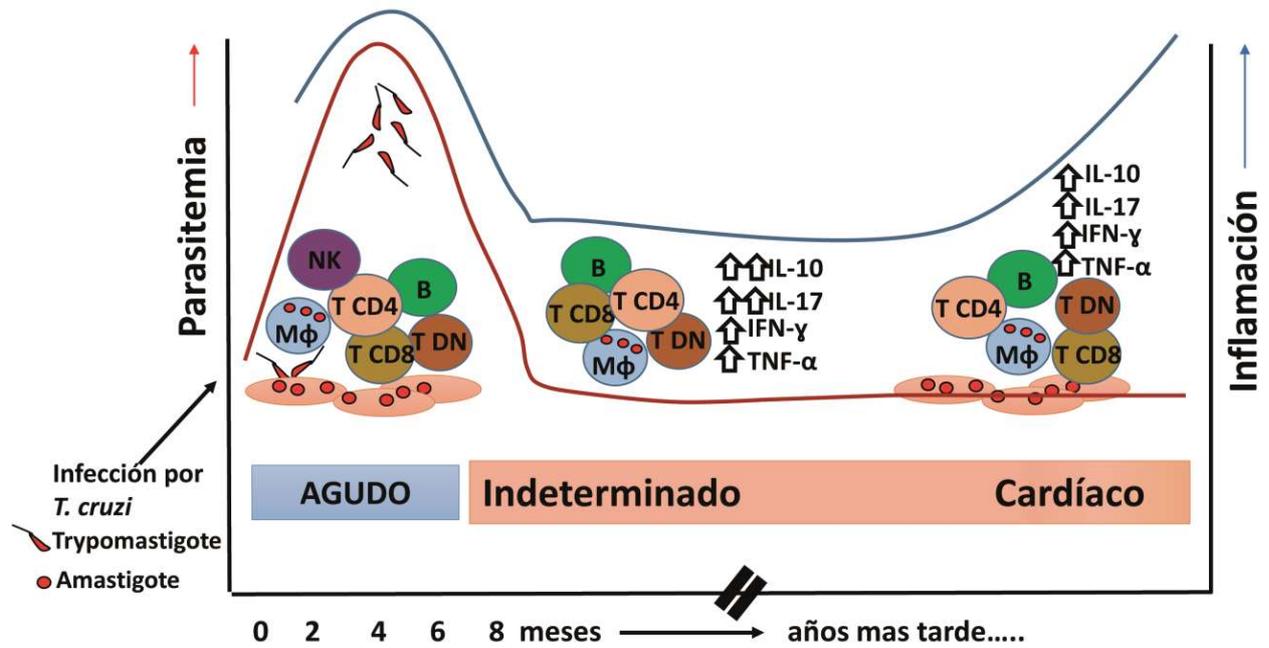


Figura 4. Componentes principales de la respuesta inmunológica hacia el *Trypanosoma cruzi*. MØ: macrófagos; T CD8: linfocitos T CD8+; T CD4. Linfocitos T CD4+; T DN, linfocitos T doble negativos NK: células “natural killer”; B: linfocitos B. Adaptado de Machado y col., 2012.

denominadas “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMP) y son reconocidas por diferentes moléculas denominadas “receptores de reconocimiento de patrones” (PRR), propias de los componentes celulares del sistema inmune innato. Dentro de la familia de los PRR se encuentran los TLR (receptores del tipo Toll), mediante el reconocimiento de los PAMPs, transmiten señales intra-citoplasmáticas de activación, producción de citoquinas inflamatorias convirtiéndose en la transición entre las respuesta innata y adaptativa (Medzhitov R y col., 2007; Yamamoto M y col., 2010; Machado FS y col., 2006).

En las etapas tempranas de la infección por *T. cruzi*, el ADN parasitario, glico-conjugados de membrana y PAMP son reconocidos por los macrófagos y células dendríticas a través de los receptores TLR2, TLR4 y TLR9, lo cual induce su activación, secreción de citoquinas y quemoquinas, que conducen a endocitosis y muerte intracelular del parásito. Los macrófagos producen IL-12 que inducen la producción de IFN- γ por las células NK que actúa sobre los

macrófagos elevando la producción de IL-12, TNF- α y NO, limitando el crecimiento de los parásitos intracelulares, principalmente a través del mecanismo mediado por óxido nítrico (Cardillo F y col., 1996; Sathler-Avelar R y col., 2003). Por otro lado, ambos tipos celulares secretan citoquinas regulatorias como IL-10 e IL-4 que reducen los daños asociados a una excesiva estimulación provocada por las citoquinas pro-inflamatorias (Sathler-Avelar R y col., 2009). En esta etapa también se describen elevados niveles de mediadores como IL-2, IL-6 e IL-18 que podrían estar involucrados en los mecanismos de protección contra el parásito (Cunha-Neto E y col., 2009). Por otro lado, se ha demostrado que la citoquina IL-17 regula el reclutamiento de células inflamatorias y su diferenciación a respuesta de tipo Th1 en el tejido cardíaco (da Matta Guedes PM y col., 2010). Las células Th1 son las responsables de la producción de las citoquinas pro-inflamatorias, mientras que las células Th2 poseen una función anti-inflamatoria y se encargan de la respuesta inmune mediada por anticuerpos. Las citoquinas IL-12 e IL-18 son producidas por las células dendríticas y macrófagos que promueven la formación de células de tipo Th1 productoras de IFN- γ ; en cambio, la producción de IL-4 por estas células induce la expansión de células de tipo Th2 con altos niveles de IL-10 (Machado FS y col., 2012). La citoquina IL-4 induce además la producción de TGF- β que regula la actividad de las células presentadoras de antígeno y aumenta la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* (Cardillo F y col., 2007).

Linfocitos NK

Los linfocitos NK son importantes en el control de la parasitemia, habiéndose sugerido su rol como puente entre la respuesta inmune innata y adaptativa temprana (Vitelli-Avelar DM y col., 2006). Se ha demostrado que los individuos en estadio indeterminado (G0) muestran mayores porcentajes de linfocitos NK maduros (CD3-CD16+CD56+) y disminución de los NK precursores (CD3-CD16+CD56-) respecto de los controles, sugiriendo el posible rol protector de los mismos en el control de la morbilidad durante la infección crónica (Vitelli-Avelar DM y col., 2005). También, se han observado elevados niveles de linfocitos NKT de tipo 2 (CD3-CD16-CD56+) y T CD8+

activados (HLA-DR+) en individuos G0 (Vitelli-Avelar DM y col., 2005). Esto último, podría deberse a que los linfocitos NKT poseen un rol modulador sobre la activación de los linfocitos T CD8+ vía apoptosis y la secreción de citoquinas regulatorias, contribuyendo al control de la actividad citotóxica deletérea por parte de los linfocitos T CD8+ activados (Godfrey DI y Kronenberg M, 2004; Murray DA y Crispe IN, 2004). Es posible que una regulación inmune deficiente en los individuos con cardiomiopatía se relacione con la exacerbación de la respuesta inmune que conduce una fuerte respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8+, con el consecuente daño tisular.

Macrófagos

Además de la participación de los linfocitos NK y NKT en el control de la morbilidad de la enfermedad de Chagas crónica, también se ha descrito una alta frecuencia de macrófagos (CD14+CD16+) en los individuos G0, que favorecería el control de la infección en el estadio indeterminado de la enfermedad (Vitelli-Avelar DM y col., 2006). La función de los macrófagos se encuentra polarizada entre el perfil inflamatorio, activado por la vía clásica (M1, dependiente de IFN- γ y TNF- α), y regulatorio, activado por la vía alternativa (M2, dependiente de IL-4 e IL-13). La función principal de los M1 es la producción de NO, metabolitos reactivos del oxígeno y citoquinas pro-inflamatorias, y la función de los M2 es la producción de IL-4, IL-10 e TGF- β (Stempin CC y col., 2010). Durante la infección aguda por *T. cruzi* la inducción de una respuesta de tipo M1 es crucial para controlar la parasitemia, pero si la activación de los macrófagos M2 no es regulada adecuadamente, puede causar severos daños a los tejidos del huésped. Por lo tanto, la evolución de la infección por *T. cruzi* depende de la magnitud de la respuesta y la activación de los macrófagos M1/M2 por la vía clásica vs. la vía alternativa (Stempin C y col., 2002). Por otro lado, en la etapa crónica se ha descrito elevada producción de IL-10 en cultivos de monocitos obtenidos de pacientes asintomáticos infectados o activados con *T. cruzi* in vitro, mientras que los mismos

estímulos promovieron la producción de TNF- α en monocitos de pacientes con manifestaciones cardíacas severas (Souza PE y col., 2004; Vitelli-Avelar DM y col., 2008).

Células dendríticas

Por otro lado, existen evidencias que el *Trypanosoma cruzi* también ejerce una acción inmunomoduladora sobre las células dendríticas. Por ejemplo, van Overtvelt y col. observaron disminución de citoquinas IL-6, IL-12 y TNF- α y de los marcadores de activación HLA-DR y CD40 en células dendríticas estimuladas con trypomastigotes vivos in vitro, sin inducir cambios en la expresión de CD80 y CD86 (Van Overtvelt L y col., 1999). En cambio en la infección murina experimental por *T. cruzi* se ha observado que la expresión de los marcadores de activación MHC de clase II, CD80 y CD86 depende de la cepa del parásito infectante (Alba Soto CD y col., 2003). Por otro lado, la infección de células dendríticas de médula ósea de ratón con *T. cruzi* in vitro resulta en un aumento de TGF- β y de la relación IL-10/IL-12 en infectadas con (Poncini CV y col., 2008).

Respuesta inmune adaptativa

La respuesta inmune adaptativa se desarrolla más tardíamente, y sus principales características son la especificidad antigénica y generación de memoria inmunológica capaz de montar una respuesta rápida ante un nuevo encuentro con el mismo patógeno. Existen dos tipos principales de respuesta adaptativa, celular y humoral. La primera es mediada principalmente por linfocitos T, derivados del timo y está dirigida a microorganismos intracelulares que son inaccesibles a los anticuerpos circulantes. En cambio la respuesta humoral actúa contra microorganismos extracelulares y sus toxinas, mediada por anticuerpos producidos por los linfocitos B, derivados de médula ósea que reconocen los antígenos foráneos y neutralizan sus productos.

Linfocitos T

Las células presentadoras de antígeno procesan proteínas derivadas del espacio extracelular o del citosol convirtiéndolas en péptidos, los cuales son procesados y expuestos en la superficie celular en asociación con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II

(MHC-I y II) en los órganos linfoides periféricos (principalmente en ganglio linfático, bazo y placas de Peyer de mucosas). Prácticamente todas las células nucleadas del organismo son capaces de presentación antigénica en el contexto de MHC-I. En cambio, el repertorio celular con capacidad de presentación antigénica en el contexto MHC-II es más acotado; estas células presentadoras profesionales de antígeno (APC) incluyen las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, siendo las primeras las más eficaces en la activación de los linfocitos T vírgenes. Los linfocitos T reconocen péptidos derivados del patógeno presentados en el contexto del complejo MHC- I y II a través de la interacción con el receptor de células T (TCR) y con moléculas de co-señalización expresadas por dichas poblaciones (T-APC) desencadenando la selección y activación de los linfocitos vírgenes específicos de linaje T CD8+ y CD4+, respectivamente. Durante el primer encuentro con un microorganismo, se seleccionan los linfocitos T vírgenes que expresan un TCR de alta afinidad para un determinado antígeno (existen en muy baja frecuencia en los huéspedes que nunca han estado expuestos al mismo), y se produce la expansión clonal de los mismos (fase de expansión) que culmina con la adquisición de la función efectora. En caso de derivar en una respuesta efectiva, los linfocitos T específicos promoverán la eliminación del antígeno que disparó la activación. Posteriormente, la población celular T específica disminuye su frecuencia a través de procesos que involucran apoptosis (fase de contracción), estableciendo en un estado de latencia (homeostasis), generándose una población de linfocitos T de memoria capaz de montar una respuesta rápida ante un nuevo encuentro con el mismo patógeno. La magnitud de la respuesta de los linfocitos T efectores está directamente relacionada con la carga antigénica, mientras que la fase de contracción es aparentemente independiente de la carga antigénica inicial o persistencia del antígeno (Murali-Krishna K y col., 1998; Badovinac VP y col, 2002).

El estado funcional de las células nos permite distinguir poblaciones de linfocitos T en diferentes estadios de maduración, principalmente vírgenes, efectores y memoria. Aunque inicialmente se distinguían 2 tipos de células T CD4+ en base al perfil de secreción de citoquinas, Th1 (IFN- γ , TNF

e IL-2) y Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF) (Mosmann TR y , 1989), en la actualidad se distinguen 6 tipos: Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13), Th9 (IL-9 y IL-10), Th17 (IL17A, IL-17F, IL-21, IL-22), Th22 (IL-22), Treg (IL-10 y TGF- β) y Tfh (IL-21) (Cosmi L y col., 2014). En cuanto a los linfocitos T CD8⁺ actualmente se distinguen 5 diferentes subpoblaciones en base al perfil de citoquinas y moléculas citotóxicas secretadas: Tc1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2 y granzyma/perforina), Tc2 (IL-4, IL-5, IL-13 y granzyma/perforina), Tc9 (IL-9 y IL-10), Tc17 (IL-17 y IL-21) y Treg (IL-10 y TGF- β) (Mittrücker HW y col., 2014).

El estudio de la respuesta inmune específica para *T. cruzi* en individuos infectados con el parásito han mostrado numerosas alteraciones del compartimiento celular T en sangre periférica. El análisis de la población de linfocitos T periféricos mediante la técnica de ELISPOT y de tinción intracelular de citoquinas mostró mayor frecuencia e intensidad de respuesta de linfocitos T específicos de memoria para *T. cruzi* productores de IFN- γ y baja respuesta antígeno-específica productora de IL-4 en pacientes asintomáticos (G0) y con síntomas leves (G1) que en los pacientes con formas más severas de enfermedad cardíaca (G2 y G3) de Argentina (Lauella SA y col., 2004; Albareda MC y col., 2009). Este mismo patrón de respuesta se observó al utilizar como estímulo antigénico, células dendríticas autólogas infectadas con *T. cruzi* como células presentadoras de antígeno, o péptidos derivados de la superfamilia de las trans-sialidasas con alta afinidad de unión al haplotipo HLA-A0201 (Albareda MC y col., 2006; Álvarez MG y col., 2008). Menos del 30% de los pacientes evaluados mostraron producción de IL-2 específica para *T. cruzi* asociada a IFN- γ , mientras que no se registró producción de IL-2 como única respuesta en ninguno de los individuos evaluados, independientemente del estadio clínico (Alvarez MG y col., 2008). El estudio de la expresión de CD45RA, CD27 y CD28 en la población total de linfocitos T de estos pacientes reveló una disminución de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ vírgenes y de memoria temprana, y aumento de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria totalmente diferenciados (CD28⁻) con aumento de la expresión de marcadores de senescencia (CD57) y caspasa-3 a medida que el compromiso cardíaco

es más severo. Este perfil de senescencia y diferenciación es indicativo de una activación crónica del sistema inmune por la persistencia parasitaria. La eliminación de clones de linfocitos T específicos para el parásito capaces de montar una respuesta protectora, y el sustancial impacto de la infección crónica sobre la población total de linfocitos T promovería un estado de agotamiento clonal y senescencia de la población de linfocitos T CD8+ y CD4+ (Albareda MC y col., 2006 y 2009).

El análisis de otros marcadores de superficie en pacientes con enfermedad de Chagas crónica de Brasil también mostró aumento de linfocitos T CD28-, aunque describen un estado inmunológico de activación en pacientes asintomáticos o con compromiso cardíaco en base a la expresión de CD45RA y HLA-DR (Dutra WO y col., 1994, 1996). Sin embargo, otros autores han mostrado resultados opuestos a los anteriores, observando que la frecuencia de linfocitos T específicos para el parásito productores de IFN- γ en pacientes con manifestaciones cardíacas severas de Brasil es mayor que en pacientes asintomáticos, y un patrón inverso al estudiar la producción antígeno-específica de IL-10 (Correa-Oliveira R y col., 1999; Gomes JA y col., 2003; Souza PE y col., 2007; Vitelli-Avelar DM y col., 2008; Lorena VM y col., 2010). Otros autores observaron mayor frecuencia de linfocitos T regulatorios CD25+FOXP3+ en pacientes asintomáticos que en pacientes con manifestaciones cardíacas severas (Vitelli-Avelar DM y col., 2005; Araujo FF y col., 2007). Según los autores, la producción de IFN- γ y TNF- α en respuesta al parásito estaría implicada en el desarrollo del daño cardíaco, mientras que la producción de IL-10 en conjunto con la acción de linfocitos T regulatorios, permitiría prevenir el desarrollo de daño cardíaco (Dutra WO y Gollob KJ, 2008; Fiuza JA y col., 2009; de Araujo FF y col., 2011).

Las células T doble negativas (DN, que no expresan los receptores CD4 y CD8) constituyen una población menor en sangre periférica. Estas células producen citoquinas inmunoregulatorias y bajo diferentes circunstancias también ejercen actividad citotóxica. Una subpoblación de células T DN se activa a través de la interacción del TCR/ MHC no clásicas (del tipo moléculas de la familia CD1)

presentando antígenos lipídicos o glicolipídicos. Si bien la infección por *T. cruzi* no afecta particularmente su frecuencia en sangre periférica, la exposición de PBMC de individuos infectados sintomáticos y asintomáticos a trypomastigotes in vitro induce su rápida expansión y expresión de citoquinas pro- inflamatorias (IFN- γ , TNF- α e IL-17) y anti-inflamatorias (IL-10), respectivamente. En los pacientes asintomáticos aumenta la relación IL-10/citoquinas pro-inflamatorias producidas por las células T DN, sugiriendo un rol potencial de los antígenos lipídicos derivados de la interacción huésped-parásito en la activación de estas células. Debido a que las células T DN son capaces de reaccionar rápidamente y tolerar la estimulación crónica es posible que estas células participen tanto en la respuesta innata como la adaptativa en la enfermedad de Chagas (Villani FN y col., 2010).

Es difícil conciliar los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación. Las discrepancias podrían estar relacionadas tanto a diferencias geográficas, socioeconómicas y epidemiológicas de las poblaciones involucradas, diferencias en la preparación de los antígenos utilizados en los ensayos y marcadores empleados para la identificación de las diferentes poblaciones celulares, y las condiciones técnicas empleadas para las mediciones. También puede deberse a diferencia en la categorización de las alteraciones cardíacas de la enfermedad utilizadas por los diferentes grupos de investigación.

Linfocitos B

El desarrollo, activación y diferenciación de las células B es un proceso altamente regulado para mantener la homeostasis y generar una respuesta humoral efectiva. Derivan de células madres hematopoyéticas que se diferencian a células B progenitoras (pro-B), células B inmaduras, transicionales (Sagaert X y col., 2003) y vírgenes en la médula ósea (MO) y migran a órganos linfoides secundarios (Cariappa A y col., 2006). Cada célula B virgen posee una molécula unida a la membrana que actúa como principal receptor de células B maduras (BCR), análogo al receptor de las células T (TCR). El BCR está constituido por una inmunoglobulina transmembrana de cadena

pesada (IgH) covalentemente asociada a una inmunoglobulina de cadena liviana (IgL), que mediante la yuxtaposición de las regiones determinantes complementarias (CDR, región variable) de ambas cadenas dan origen a una región única de unión antigénica específica para cada BCR. Cada BCR posee especificidad para un único antígeno, y cada célula B tiene un único tipo de receptor, de manera que cada célula tiene especificidad para sólo un antígeno. La señalización a través del BCR depende de dos proteínas (Ig α y Ig β) asociadas en forma no covalente que poseen secuencias ITAMs (abreviado del inglés, inmunoreceptor con motivos de activación basados en tirosina) en su dominio intracelular. Los sitios ITAM son fosforilados por Lyn (tirosina quinasa de la familia de Src), generando el sitio apropiado para el reclutamiento de Syk (abreviado del inglés, tirosina quinasa del bazo) al complejo BCR, amplificando la señal de activación. La señalización a través del BCR también induce el reclutamiento de diferentes co-receptores de superficie (positivos y negativos) que se localizan constitutivamente o transitoriamente junto al BCR, por lo cual son frecuentemente considerados como parte del complejo BCR (Obino D y Lennon-Duménil AM, 2014). La señalización a través del BCR induce el reclutamiento del co-receptor de superficie CD19, el cual es una glicoproteína transmembrana de 95-kDa que se expresa durante todo el desarrollo de la célula B. La unión antígeno-BCR induce el reclutamiento de quinasas y fosforilación del dominio intracitoplasmático de CD19, amplificando la señal de activación producida. En asociación al BCR existen otros co-receptores transmembrana que poseen motivos ITIMs (abreviado del inglés, inmunoreceptor con motivos de inhibición basados en tirosina), como CD22 (inmunoglobulina del tipo lectina que une ácido siálico o Siglec) y PIRB (receptor B del tipo inmunoglobulina que reconoce la porción Fc de la IgG). La interacción del BCR con un antígeno unido a ácido siálico o con la porción Fc de la IgG induce la fosforilación de los motivos ITIM y el reclutamiento de fosfatasas que inhiben las señales de activación. Se ha propuesto que este mecanismo es responsable de regular la activación por antígenos propios y promover tolerancia (Avalos AM y col., 2014).

La maduración funcional de las células B vírgenes transcurre en el tejido linfóide secundario, donde

adquieren su capacidad efectora (producción de anticuerpos, secreción de citoquinas y presentación de antígenos y moléculas co-estimuladoras a linfocitos T). El reconocimiento de antígenos foráneos transportados por la linfa a través del BCR induce su migración hacia el borde de la zona T folicular (Benson MJ y col., 2009; Garside P y col., 1998). La unión del antígeno al BCR induce su internalización y degradación en péptidos que se unen luego a las moléculas del MHC-II y son expuestos en la superficie celular (Pape KA y col., 2007). El complejo péptido-MHC-II en la superficie de la célula B activada es reconocido por la célula T CD4⁺ colaboradora folicular específica, induciendo la expresión de CD40L y secreción IL-4 e IFN- γ por estas últimas. La interacción CD40/CD40L junto con los receptores de las citoquinas en las células B induce su activación y proliferación, y promueve la recombinación del isotipo de Ig (CSR) (Gatto D y col., 2010; Snapper CM y col., 1993) (Figura 5).

Las células B con cambio de isotipo pueden diferenciarse a células plasmáticas de corta vida, células de centro germinal (CG), o células de memoria CG-independientes, de acuerdo a la expresión de los factores de transcripción Bcl-6 y Blimp-1 (Figura 5). En la respuesta primaria, la mayoría de las células B de memoria IgM⁺ provienen de las células B activadas que reciben una fuerte señal de las células Tfh en la zona B/T (Figura 5), mientras que las células B de memoria con cambio de isotipo provienen del CG (Figura 6). Ante una segunda exposición con el antígeno (respuesta secundaria), las células B vírgenes y de memoria IgM⁺ poseen la capacidad de expandirse y diferenciarse con una cinética similar a la respuesta primaria. En contraste, las células B de memoria con cambio de isotipo contribuyen a la generación de células plasmáticas más rápidamente que las células B vírgenes o de memoria IgM⁺, aunque pierden la capacidad de re-ingresar al CG (Dogan I y col., 2009; Pape KA y col., 2011; Aiba Y y col., 2010). Las células de memoria IgM⁺ responden de manera menos efectiva durante la reinfección con el mismo patógeno, aunque pueden ser importantes para el reconocimiento de variantes mutadas del mismo, ingresando al CG para adquirir nuevas variantes de su BCR que reconocerán con mayor afinidad al patógeno mutado (Pape KA y col., 2011). La

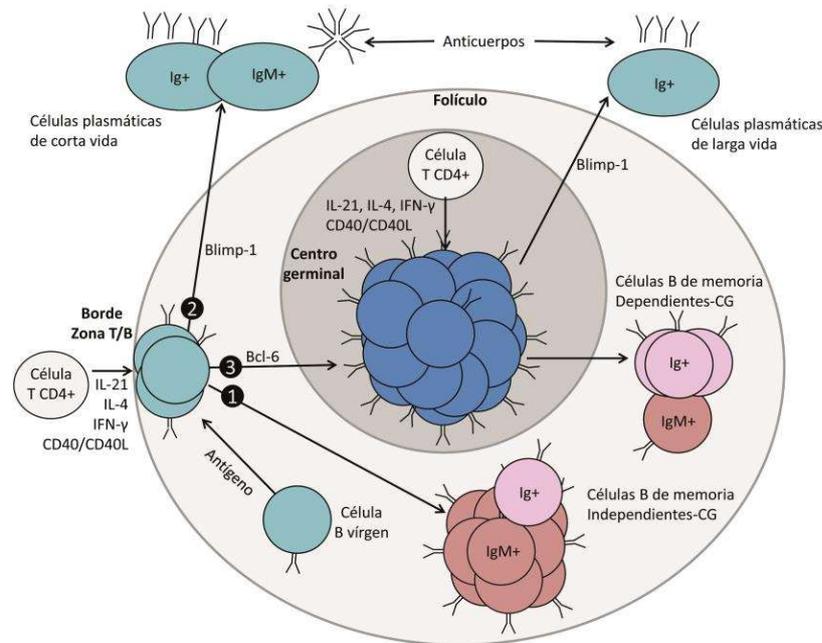


Figura 5. Diferenciación de las células B dependientes de células T. La estimulación del BCR por el antígeno induce la migración de las células B vírgenes hacia la zona de células T en el borde del folículo, en donde reciben señales de proliferación de las células T CD4⁺ complementarias a través de la interacción de CD40/CD40L y citoquinas con sus respectivos receptores. Esta interacción puede inducir: 1) migración hacia el interior del folículo por fuera del CG para diferenciarse en células B de memoria CG-independiente; 2) expresión de Blimp-1 para migrar hacia afuera del folículo y convertirse en célula plasmática de corta vida, o 3) expresión de Bcl-6 para migrar hacia el interior del folículo y establecer centros germinales, en donde proliferan y son sometidas a maduración de la afinidad de su receptor BCR de manera CG-dependiente. La ausencia de señales por parte de las células Tfh resulta en la muerte de la célula B, mientras que las células que reciben la señalización pueden diferenciarse a células B de memoria o generar células plasmáticas de larga vida. La mayoría de las células B de memoria CG-dependiente sufren cambio de isotipo en sus inmunoglobulinas (IgG, IgA o IgE), mientras que la mayoría de las células B de memoria CG-independiente continúan expresando IgM. Adaptado de Taylor JJ y col., 2012.

plasticidad de las células B de memoria IgM⁺ en la respuesta secundaria les permite actuar como progenitoras de células B de memoria antígeno-específica con cambio de isotipo (Pape KA y col., 2011; Crotty S y col., 2004). Es decir, que las células B de memoria IgM⁺ y con cambio de isotipo difieren en su localización, persistencia, y capacidad de diferenciación en la respuesta secundaria.

La mayor parte del conocimiento actual sobre la respuesta inmune celular B y humoral inducida por la infección con *T. cruzi* proviene de estudios en modelos experimentales. Se ha demostrado que la infección de ratones deficientes en células B maduras provoca aumento del parasitismo, disminución de la inflamación y generación deficiente de células T de memoria centrales y efectoras, indicando el rol crucial de las células B en el control del crecimiento del parásito y la modulación de la respuesta celular T (Cardillo FE y col., 2007). Por otro lado, se ha demostrado que el parásito induce un estado de activación policlonal en la fase aguda de la infección, con aumento de apoptosis de células B memoria IgG⁺ específicas y disminución de células B inmaduras y plasmáticas en médula ósea (Acosta-Rodríguez EV y col., 2007). Además de la producción de anticuerpos, las células B también ejercen otras funciones, tales como la secreción de citoquinas, presentación antigénica y de señales co-estimuladoras a las células T, esenciales para la homeostasis del sistema inmune. (Tretter T y col., 2008; Tangye SG y col., 2012; Zabel F y col., 2013; Fares RC y col., 2013; Bao Y y Cao X, 2014). Se ha descrito que los linfocitos B secretan IL-17 en respuesta a la infección por *T. cruzi* de manera independiente de ROR γ t, induciendo el reclutamiento de neutrófilos productores de IL-10 que modulan la producción de IFN- γ y reducen el daño tisular (Tosello Boari J y col., 2012; Bermejo DA y col., 2013).

La información sobre el rol de la respuesta celular B en el control de la infección por *T. cruzi* y desarrollo de patología en el ser humano es escasa y segmentada. El sello distintivo de la respuesta humoral a la infección aguda en humanos es la producción de anticuerpos policlonales dirigidos contra antígenos propios e inespecíficos, retrasando el desarrollo de la inmunidad humoral específica contra el parásito (Grauert MR y col., 1993). En la infección crónica se ha descrito la producción de

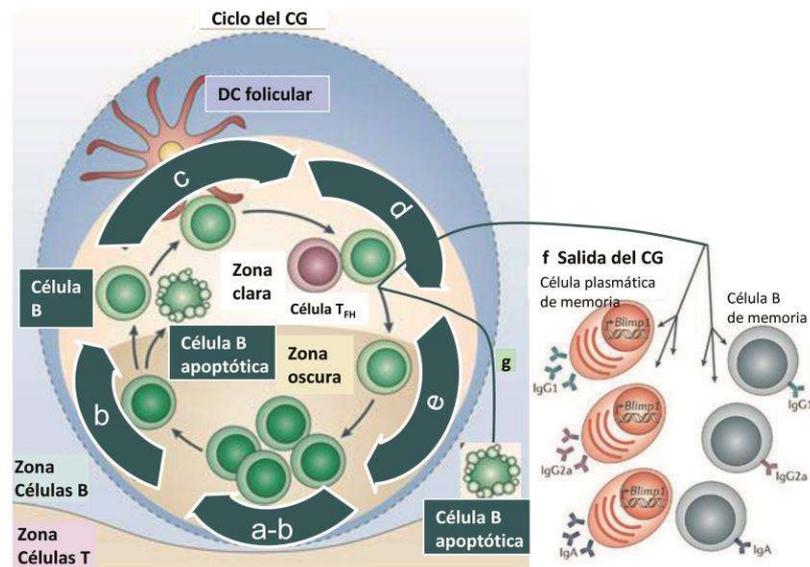


Figura 6. *Reacción antígeno-específica en el CG.* **a)** Las células B antígeno-específicas activadas por las células T_{FH} complementarias expresan Bcl-6, induciendo el inicio de las reacciones del CG. **b)** En el CG se produce la hipermutación somática (SHM) y recombinación de cambio de clase de isotipo (CSR). **c)** La supervivencia de las células B depende del reconocimiento de su nuevo BCR y señalización positiva por parte de las DCs foliculares en el CG; la pérdida de afinidad de unión del BCR conduce a muerte celular por apoptosis. **d)** La selección y diferenciación de las células B con BCR de alta afinidad por el antígeno es determinada por su interacción con el TCR de las T_{FH} (péptido-MHC-de clase II). El reconocimiento del antígeno puede inducir: **e)** la re-entrada de la célula B al ciclo del CG para re-iniciar la diversificación del BCR (proliferación celular, SHM y CSR), **f)** la salida del CG en forma de célula B de memoria no secretora de anticuerpos o células plasmáticas de larga-vida, o **g)** apoptosis. Adaptado de McHeyzer-Williams M y col., 2011.

anticuerpos dirigidos contra estructuras del parásito capaces de reconocer diferentes proteínas del huésped, entre ellos los anticuerpos anti-receptores beta adrenérgicos y calreticulina, y anticuerpos asociados al daño cardíaco tales como anti-troponina y anti-miosina (Cunha-Neto E y col., 2011; Talvani A y col., 2006; Vicco MH y col., 2013; Tovar NC y col., 2009; Dhiman M y col., 2012; Nunes DF y col., 2013; Ramirez G y col., 2011). Otros autores han mostrado que anticuerpos anti-epimastigotes aislados del suero de individuos infectados son capaces de inducir la proliferación

PBMC, linfocitos B totales y células CD5⁺ (Dutra WO y col., 2000). La ausencia o escaso número de células B y células plasmáticas en las lesiones inducidas por *T. cruzi* en los tejidos (Reis DD y col., 1993; Castro-Côbo EC y col., 2012) sumado a la baja especificidad para el parásito (Grauert MR y col., 1993; Minoprio P y col., 1988) han conducido a la hipótesis que otorga un rol secundario a las células B en la patogénesis de la infección por *T. cruzi* (Kumar S y Tarleton RL., 1998). Diferentes autores han descrito aumento de los porcentajes de células B totales circulantes, células B activadas CD5⁺ (extensamente estudiadas en el modelo murino pero escasamente representadas en la población celular B del ser humano) y HLA-DR⁺, sugiriendo que estas células se encuentran involucradas en el desarrollo de la patología cardíaca de la enfermedad Chagas (Dutra WO y col., 1994, 2000; Piedras J y col., 1997). El importante avance en el conocimiento de la compartimentación y funcionalidad de las células B en la última década ha significado un resurgimiento de la investigación de las mismas en las principales patologías que involucran a las células B, como por ejemplo enfermedades autoinmunes, células B malignas e infecciosas. Numerosos trabajos han demostrado que el perfil fenotípico de linfocitos B se afecta diferencialmente, observándose alteración de determinadas subpoblaciones celulares B en asociación con las diferentes patologías. En la enfermedad de Chagas crónica humana, se describió recientemente aumento de la expresión de intracelular de caspasa 3, granzima B, IL-10, TGF- β en las células B CD19⁺, y de los receptores de superficie CD21 (involucrado en activación y diferenciación de células B CG-dependiente), CD24 (diferencialmente expresada en diferentes estadios de maduración de células B) y HLA-DR (MHC-clase II, marcador de activación celular) (Fares RC y col., 2013). Si bien estos marcadores son útiles para determinar funcionalidad celular, no permiten identificar los diferentes estadios de maduración y diferenciación de la población de linfocitos B, regulados en parte por los linfocitos T CD4⁺. Por otro lado, los linfocitos B modulan parcialmente de la respuesta celular T CD4⁺ a través de la presentación antigénica y expresión de moléculas co-estimuladoras. Por lo tanto, es posible que las alteraciones descritas en la población

de linfocitos T periféricos de pacientes con enfermedad de Chagas crónica afecte la composición de la población de células B circulantes.

2.OBJETIVOS

2.1.Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de tesis es caracterizar las principales subpoblaciones de linfocitos B de sangre periférica y su potencial relación con alteraciones de linfocitos T CD4+ y la progresión de la enfermedad de Chagas crónica humana. Para ello, se determinará el perfil fenotípico y funcional de los linfocitos B periféricos en individuos con enfermedad de Chagas crónica, y su relación con la población T CD4+ activada. La profundización del conocimiento de la respuesta inmune específica contra el *T. cruzi* a través del estudio del perfil de maduración, activación y funcionalidad de los linfocitos B periféricos de pacientes con la enfermedad de Chagas crónico aportará importante información acerca de su participación en los mecanismos involucrados en el desarrollo y/o progresión de la enfermedad cardíaca.

2.2.Objetivos específicos

- Caracterizar por citometría de flujo el perfil de maduración (inmadura/virgen/memoria) y diferenciación a célula plasmática de los linfocitos B circulantes ex–vivo en sangre periférica de individuos con infección crónica por *Trypanosoma cruzi*.
- Evaluar si existe relación entre el perfil fenotípico del compartimiento celular B periférico ex–vivo y el estadio clínico de la enfermedad de Chagas cardíaca.
- Determinar la posible relación entre el perfil fenotípico del compartimiento celular B periférico y la población de linfocitos T CD4+ activados ex–vivo.
- Evaluar si existe compromiso de las vías de co–señalización de las subpoblaciones celulares B y T CD4+ a través de la expresión ex–vivo de diferentes marcadores de superficie.
- Determinar la funcionalidad de los linfocitos B periféricos a través de la secreción de IgG específica y total en ensayos de estimulación antigénica específica y policlonal in vitro.

MATERIALES Y METODOS

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.Diseño experimental

El trabajo de tesis consistió en un estudio transversal de la respuesta inmune celular B y humoral en individuos con infección crónica por *T. cruzi* residentes de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Provincia de Buenos Aires y áreas endémicas de Santiago del Estero con transmisión vectorial activa. Una población de personas no infectadas seleccionadas entre el personal de la institución o familiares de pacientes que concurren al Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chabén” (INP) para diagnóstico y atención médica fueron incluidos como población control. La infección por *T. cruzi* se determinó mediante técnicas de serología convencional. Todos los participantes fueron evaluados clínicamente por médicos cardiólogos con experiencia en la enfermedad de Chagas. El examen clínico incluyó electrocardiograma (ECG), ergometría, radiografía de tórax y ecocardiograma. Se excluyeron del estudio a aquellos pacientes con enfermedad de Chagas o controles no infectados con antecedentes de hipertensión arterial, enfermedad cardíaca vascular, isquémica o congénita, cáncer, infección por HIV, sífilis, diabetes, artritis o alergia. Los protocolos de estudio fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chabén” (Anexo). Tanto la participación de los pacientes como la de los controles no infectados quedó documentada mediante la firma de un consentimiento informado. Se extrajeron 40-50 ml de sangre periférica mediante un sistema de colección de sangre al vacío utilizando tubos con y sin heparina para la determinación del fenotipo de las células B circulantes y reactividad sérica contra *T. cruzi* respectivamente. Los resultados de los ensayos de la serología convencional, parasitológicos y clínicos fueron informados a todos los participantes por escrito inmediatamente después de su realización.

3.2.Diagnóstico serológico

Se realizó el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* a todas las personas incluidas en este estudio mediante las tres técnicas serológicas convencionales utilizadas de rutina en el Departamento de

Diagnóstico del Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chaben” (INP). Estas técnicas son: 1) inmunofluorescencia indirecta (IFI, realizada con epimastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahuén formalizados, titulación de corte 1/32), 2) hemaglutinación indirecta (HAI, preparada con el sobrenadante del macerado de 28 cepas de *T. cruzi* de cultivo, titulación de corte 1/32) y 3) inmunoensayo enzimático (ELISA, realizada con antígeno soluble de un homogenato total de epimastigotes cepa Tulahuén, titulación de corte 0,200; Dra. Mónica Esteva INP, comunicación personal). Todas las técnicas fueron desarrolladas y validadas en el INP, usando procedimientos estándares de diagnóstico (Cura EN y Segura EL, 1998). Las personas que resultaron positivas en al menos 2 de las 3 reacciones, fueron consideradas infectadas con *T. cruzi*.

3.3. Características de la población estudiada

El estudio incluyó un total de 61 individuos con infección crónica por *T. cruzi* (promedio de edad= 42,2 años, rango de edad= 20-73 años) y 45 adultos sanos (promedio de edad= 40,1 años, rango de edad= 19-69 años) que cumplieran con los criterios de exclusión detallados anteriormente. Los participantes con serología positiva para *T. cruzi* fueron agrupados de acuerdo al estadio clínico de la enfermedad de acuerdo a una versión modificada de la clasificación de Kuschnir para pacientes con enfermedad de Chagas crónica (Kuschnir E y col., 1985; Viotti R y col., 2006). En el grupo de infectados se incluyeron 31 individuos en estadio G0 (promedio de edad= 39,7 años, rango de edad= 21-73 años), 24 individuos en estadio G1 (promedio de edad= 43 años, rango de edad= 20-66 años) y 6 individuos con miocardiopatía chagásica crónica en estadio G2 (promedio de edad= 52,7 años, rango de edad= 41-64 años), según clasificación de Kuschnir. En todos los ensayos se contempló que la edad de los participantes de los grupos infectados y controles no tuvieran diferencias estadísticas significativas entre sí o con el grupo control (Kruskal-Wallis), previo al inicio de los ensayos.

3.4. Aislamiento de células mononucleares de sangre periféricas (PBMC) y citometría de flujo

Se extrajeron 40-50ml de sangre periférica de un total de 48 individuos con infección crónica por *T. cruzi* (promedio de edad= 42,8 años, rango de edad= 20-65 años) y 24 adultos sanos (promedio de edad= 36,9 años, rango de edad= 25-69 años). En el grupo de infectados se incluyeron 22 individuos en estadio G0 (promedio de edad= 39,5 años, rango de edad= 26-58 años), 20 individuos en estadio G1 (promedio de edad= 41,7 años, rango de edad= 20-65 años) y 6 individuos con miocardiopatía chagásica crónica en estadio G2 (promedio de edad= 52,7 años, rango de edad= 41-64 años), según clasificación de Kuschnir.

Se aislaron las PBMC a partir de la sangre periférica extraída mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Bio-Sciences AB), siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez aisladas, las PBMC fueron lavadas y re-suspendidas en medio RPMI-1640 conteniendo 45% de suero fetal bovino (SFB) y 10% dimetilsulfóxido y criopreservadas en nitrógeno líquido hasta su utilización en los ensayos.

Para el estudio del perfil fenotípico de las células B y T periféricas, se trataron las PBMC con anticuerpos monoclonales dirigidos a diferentes marcadores de superficie (Tabla 1), conjugados con distintos fluorocromos. La selección de anticuerpos incluyó anti CD19 PE-Cy7, anti CD4 APC, anti CD10 APC anti, anti CD138 APC, anti CD27 FITC, anti IgD PE, anti IgG APC, anti IgM PE-Cy5.5, anti CD45RO PerCp-Cy5.5, anti CD70 PE, anti CD40 Alexa 700, anti CD154 FITC, anti CD95 PE, anti CD86 PE, anti CD69 APC (BD Pharmingen, San Diego, CA, Estados Unidos). Como marcadores de isotipo se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti IgG1 κ APC, anti IgG1 κ PE-Cy7, anti IgG1 κ FITC, anti IgG2 α PE, anti IgG1 κ PE. Se marcaron 1×10^6 PBMC con una combinación de anticuerpos durante 40 minutos a 4°C. Luego, las células fueron lavadas 2 veces con PBS conteniendo 1% SFB, y re-suspendidas en paraformaldehído al 3% (solución fijadora-estabilizadora de BD). Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACS-Aria II (Becton Dickinson, San Diego, CA, Estados Unidos), obteniéndose un mínimo de 200.000 eventos para cada una de

ellas. Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el programa Flowjo versión 7 o superior (Tree Star, San Carlos, CA, USA), seleccionándose la población de linfocitos de acuerdo a la granulosidad y tamaño de las células (FSC vs SSC).

3.5.Determinación del número absoluto de linfocitos

El número absoluto de diferentes subtipos de linfocitos fue estimado en 10 individuos infectados (promedio de edad= 46,9, rango de edad= 41-53 años) y 6 controles sanos (promedio de edad=38,8 rango de edad= 29-61 años), en base a la frecuencia de cada población por citometría de flujo y el número total de linfocitos /ml de sangre periférica obtenido mediante el Analizador Hematológico Automatizado Sysmex K-800 (Sysmex America, Inc., Mundelein, IL, USA).

3.6.Determinación de la función secretora de IgG in vitro

Se determinó la función secretora de IgG a través de ensayos de estimulación de PBMC in vitro en 9 individuos con infección crónica por *T. cruzi* (promedio de edad= 42,2 años, rango de edad= 20-66 años) y 7 adultos sanos (promedio de edad= 34,1 años, rango de edad= 22-46 años). Se cultivaron PBMC en RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB en placas de 24 pocillos (2 x 10⁶ células/pocillo, 2 pocillos/condición experimental) en presencia de un lisado de *T. cruzi* cepa Brazil (25 µg/ml) o un coctel de citoquinas (IL-2, 16 ng/ml; IL-6, 10 ng/ml y IL-10, 17 ng/ml; BD Pharmingen) (ver paper B del JI) a 37 °C con 5% CO₂. Como control se incluyeron PBMC incubadas con RPMI-1640 suplementado con 10% SFB sin estímulo. Luego de 5 días de cultivo, se recuperaron las células y los sobrenadantes para el análisis fenotípico por citometría de flujo y determinación de los niveles de IgG *T. cruzi*-específica y total por ELISA, respectivamente.

Para la determinación de los niveles de IgG secretados durante el cultivo celular, se pre-trataron placas de 96 pocillos con lisado de epimastigotes de *T. cruzi* (5 µg/ml) o anti-IgG humano de conejo (10 µg/ml; Dako, Denmark) durante 14-16 h a 4 °C. Las placas fueron luego lavadas con PBS-Tween-20 y bloqueadas con 5% de leche descremada-PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, previamente a la incubación de los sobrenadantes (50 µl/pocillo sin diluir, por duplicado) durante

45 minutos a 37 °C. Luego, las placas fueron lavadas con PBS e incubadas con anti- IgG humana conjugada con peroxidasa (HRP; Dako, Dinamarca; dil 1:1000) durante 1 hora a 37 °C. Como sustrato se empleó O-Phenilen-diamina (OPD, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) y la reacción se analizó en un lector de ELISA (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) a una longitud de onda de 490 nm. Se determinó el promedio de los valores obtenidos para los duplicados de cada muestra experimental, sustrayéndose luego el promedio de los valores obtenidos en los pocillos no estimulados (incubados solo con medio) a los pocillos incubados con lisado de *T. cruzi* o el coctel de citoquinas. Se determinó la línea de corte en base a la media + 3 SD de los títulos de IgG obtenidos para cada condición en el grupo control, considerándose respuesta positiva cuando el título resultó por encima del valor de corte.

3.7.Determinación del perfil isotópico de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específica para *T. cruzi*

Se determinó el perfil isotópico de IgG específica para *T. cruzi* por ELISA y/o Western blot (WB) en un total de 17 individuos con infección crónica, 12 individuos en estadio G0 (promedio de edad= 40,9 años, rango de edad= 21-73 años) y 5 en estadio G1 (promedio de edad= 49,8 años, rango de edad= 28-59 años), incluyéndose 18 controles (promedio de edad= 43,1 años, rango de edad= 19-61 años).

3.7.1.ELISA

Para el ensayo de ELISA se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo plano, pre-tratadas con lisado de *T. cruzi* (5µg/ml) 14-16 h a 4° C y bloqueadas con 5% de leche descremada-PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los sueros fueron diluidos 1:200, 1:25, 1:50 y 1:8 en PBS-1% leche descremada para la determinación de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 respectivamente, previo a su incubación durante 45 minutos a 37 °C en las placas pre-tratadas. Las placas fueron luego lavadas con PBS e incubadas con 100 µl/pocillo de anti-IgG1 (1: 2000), IgG2 (1:1000), IgG3 (1:500) e IgG4 (1:250) humano biotinilado (DAKO, Dinamarca) durante 1 hora a 37 °C. Luego las placas fueron lavadas con PBS e incubadas con streptavidina conjugada con peroxidasa (1:1000) durante 1 hora a

37 °C. Como sustrato se empleó O-Phenilen-diamina (OPD, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) y analizadas en un lector de ELISA (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) a una longitud de onda de 490 nm. Se determinó la línea de corte para el perfil de IgGs usando la absorbancia media de los individuos sanos + 3 desvíos estándar por triplicado. Los niveles de corte obtenidas fueron 0,024 para IgG1, 0,113 para IgG2 y 0,017 para IgG3, no evidenciándose reactividad *T. cruzi*-específica de tipo IgG4. Una respuesta se consideró positiva cuando el título fue mayor que el valor de corte.

3.7.2. Western blot

Para la técnica de WB, se trataron epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Brazil; 1×10^7 parásitos) con 40 μ l de Buffer de muestra (SDS 2% P/V, glicerol 10% V/V, azul de bromofenol 0,1% P/V, Tris-HCl 50 mM pH 6,8) con el agregado de 2-mercaptoetanol (2-ME, concentración final 10%). Las muestras fueron colocadas en baño de agua hirviendo durante 5 minutos previos a la separación de las proteínas por electroforesis, realizada a 110 volts (Bio-Rad Mini-PROTEAN 3, Hercules, CA, USA.). Se sembraron 4 μ l de la muestra/calle (aproximadamente 1×10^6 parásitos) en geles de acrilamida: bisacrilamida (30:0,8) al 12%. En cada gel se incluyó un marcador de peso molecular de amplio rango (12 a 225 kDa, Amersham, Piscataway, NJ, USA.) preteñido. Las proteínas fueron luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 90 min, a 300 mA en un equipo de transferencia (Bio-Rad Mini Trans-Blot, Hercules, CA, USA.) y teñidas con rojo Ponceau para su visualización. La membrana fue seccionada en tiras individuales para cada calle, las cuales se bloquearon con 5% leche descremada en PBS-Tween-20, 0,05% y se lavaron con 1% leche descremada en PBS-Tween-20 0,05%. Las tiras fueron luego incubadas con el suero de los pobladores de área endémica y controles, diluidos 1:50 en 1% leche descremada en PBS-Tween-20 0,05% durante 16 hs a 4 °C. Luego, se incubaron con un anticuerpo anti-IgG1 humana biotinilado, y luego incubado con streptavidina conjugada con peroxidasa, o con un anticuerpo anti-IgG conjugado con peroxidasa durante 2 horas (HRP; Dako, Dinamarca, dil 1:1000) y se trataron con

una solución sustrato y cromógeno H₂O₂/4-cloro-1-naftol para la visualización de las bandas reactivas.

3.8.Determinación de los niveles de sCD27

Se determinaron los niveles de sCD27 soluble en el suero de un total de 23 individuos con infección crónica por *T. cruzi* (7 individuos G0 promedio de edad= 42.5 años, rango = 27-52 años, 10 individuos G1, promedio de edad= 40.4 años, rango = 20-54 años) y 6 individuos con miocardiopatía chagásica G2, promedio de edad= 52,6 años, rango = 41-64 años) y 12 adultos controles (promedio de edad= 35.2 años, rango= 26-55 años), utilizando un kit comercial (Human sCD27 Instant ELISA kit, eBioscience, Vienna, Austria). Brevemente, se incubaron 100 uL del suero/pocillo (previamente diluído 1:25) durante 3 hs a temperatura ambiente en una placa de 96 pocillos con fondo plano pre-tratada con un anticuerpo de captura La placa fue luego lavada, y se incubó con solución de tetrametil-benzidina (TMB) durante 10 min a temperatura ambiente; la reacción se analizó en un lector de ELISA (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) a una longitud de onda de 620 nm hasta que llegó a una DO entre 0.6-0.65, momento en el cual se colocó la solución de frenado. Posteriormente se procedió a la lectura de las muestras a una longitud de onda de 450 nm. Se calculó la absorbancia media para cada muestra, estándar y controles por duplicado, y se sustrajo de cada uno la media de los blancos. Se graficó la curva estándar de las concentraciones de sCD27 en el eje X y las absorbancias en el eje Y, con la cual se obtuvo la ecuación de la recta, que luego fue utilizada para calcular las concentraciones de las muestras ensayadas.

3.9.Cultivo de parásitos, preparación de homogenato y de una suspensión enriquecida en proteínas derivadas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

3.9.1.Preparación de antígenos

Para la preparación de antígenos de *T. cruzi* se utilizó la cepa Brazil, aislada de un caso de Chagas agudo humano de Brasil y cedida a nuestro laboratorio por el Dr. Trischmann, (Trischmann TM y Bloom BR, 1982). Se utilizaron epimastigotes derivados de cultivos axénicos en medio LIT

suplementado con 10% de suero fetal bovino cultivados en estufa refrigerada a 28 °C. Los epimastigotes fueron lavados con PBS y sometidos a 4 ciclos de congelado a -70 °C/descongelado a 37 °C seguido de sonicación. La suspensión obtenida luego del último ciclo fue centrifugada a 12.000 rpm durante 30 minutos, se recuperó el sobrenadante y se pasó a través de un filtro de 0,22 micrones de tamaño de poro. Previo a su utilización en los ensayos, se determinó la concentración proteica de la suspensión por el método de Bradford.

3.9.2.Preparación de homogenato total de *T. cruzi*

Se cultivaron epimastigotes de *T. cruzi* cepa Brazil en medio LIT-10%SFB. Los parásitos se recolectaron, se lavaron con PBS y se determinó su concentración utilizando cámara de Neubauer en un microscopio de fase. Luego, se distribuyeron alíquotas de 1×10^7 parásitos en tubos eppendorf de 0,5 ml, los cuales fueron conservados a -20 °C hasta su utilización.

3.10.Análisis Estadístico

El análisis de los datos se realizó utilizando el programa estadístico GraphPad Prisma 5. Todas las muestras fueron sometidas al test de normalidad de la muestra de Kolmogorov-Smirnov. Para el análisis de comparación de medias de 2 muestras independientes se utilizaron los tests de Student o Mann-Whitney, y para comparaciones múltiples Análisis de la Varianza (ANOVA) seguido por la corrección de Bonferroni, o Kruskal-Wallis con el test de Dunn's para distribuciones normal y no normales respectivamente. Para análisis de correlación entre dos variables se utilizó el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson o Spearman (r), según corresponda. Resultados de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Tabla 1. Marcadores utilizados para las citometría de flujo. Su función y distribución en distintas células del sistema inmune.

Marcador	Clon de anticuerpo	Fluorocromo conjugado	Tipo celular expresando	Función
CD4	RPA-T4	APC	Linfocitos T colaboradores	Reconocimiento de CMH-II.
CD19	SJ25C1	PE-Cy7	Linfocitos B	Generación y maduración de las células B en la médula ósea y periferia.
CD10	HI10a	APC	Precusores linfocitos B	Hidrolasa, peptidasa, metaloendopeptidasa.
CD138	MI15	APC	Células plasmáticas	Modulador de la activación.
CD27	M-T271	FITC	Linfocitos T, NK, B de memoria y células plasmáticas	Coestimulación, receptor de la molécula CD70. Puede tener un rol en la supervivencia y apoptosis de los linfocitos T
CD40	5C3	Alexa 700	Linfocitos B, dendríticas foliculares, macrófagos y precusores hematopoiéticos	Desarrollo, proliferación, diferenciación cambio de isotipo de inmunoglobulina en los linfocitos B.
CD45RO	UCHL1	PerCp-C5	Linfocitos B y T	Transducción de señales
CD69	FN50	APC	Linfocitos T activados, B, NK	Moléculas involucrada en la activación, proliferación. Transducción de señales.
CD70	Ki-24	PE	Linfocitos B y T activados	Regulador de la proliferación de linfocitos T.
CD86	IT2.2	PE	Linfocitos B, T, monocitos y células dendríticas. Células dendríticas y T en órganos linfoides secundarios	Receptor de señales co-estimuladoras de las moléculas CD28 o CTLA-4.
CD95	DX2	PE	Linfocitos B y T activados	Mediador de las señales que inducen la apoptosis. Transducción de señales de proliferación.
CD154	TRAP1	FITC	Linfocitos T maduras activadas, B, NK y macrófagos. Células endoteliales y epiteliales	Moléculas co-estimuladora involucrada en la activación mediante la presentación antigénica, maduración de células T efectoras, activación de células T vírgenes CD4+ y CD8+. Regula la función de B mediante la interacción con el CD40.
IgD	IA6-2	PE	Linfocitos B vírgenes y maduros	Receptor células B de antígenos y Transductor de señales.
IgM	G20-127	PE-Cy5	Linfocitos B vírgenes y maduros	Inmunoglobulina.
IgG	G18-145	APC	Linfocitos B maduros y células plasmáticas	Inmunoglobulina, comprende a las inmunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4).

Todos los clones son derivados de hibridomas murinos.

RESULTADOS

4.RESULTADOS

4.1.Caracterización fenotípica de la población de linfocitos B en PBMC de individuos con enfermedad de Chagas crónica.

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento del impacto de la infección por *T. cruzi* en la respuesta de células B en humanos, se evaluó por citometría de flujo la composición del compartimiento celular B de sangre periférica en individuos con la enfermedad de Chagas crónica. La molécula de superficie CD19, marcador universal de la población de linfocitos B en sangre periférica fue utilizada para identificar la población total de linfocitos B circulantes en 48 individuos infectados y 24 controles (Figura 7A). El análisis de este marcador mostró que los individuos con infección crónica por *T. cruzi* tienen una disminución significativa en el porcentaje de células CD19+ en comparación con los controles ($p < 0,05$; Tabla 2). Luego se estimó el número absoluto de células CD19+ en 10 individuos infectados y 6 controles en base a la proporción de células obtenida mediante citometría de flujo, el número total de linfocitos en el hemograma y la fórmula leucocitaria. Los resultados de este análisis mostraron que el número absoluto de linfocitos CD19+ circulantes en los individuos infectados es similar al de los controles (Tabla 2).

Tabla 2. Cuantificación linfocitos B totales

Fenotipo	Control	Infectado	P
CD19+	16,8 ± 7,5	12,5 ± 6,3	0,0177
	[402 ± 192]	[266 ± 112]	0,0912
CD19+CD27+	49,6 ± 19,5	36,4 ± 6,3	0,0015
	[135 ± 70]	[66 ± 30]	0,011

Los datos representan el porcentaje medio ± DS de células que expresan los marcadores indicados (n= 24 controles y 48 infectados) y el [número absoluto medio ± DS] (n= 6 controles y 10 infectados). Análisis estadístico: prueba de Mann-Whitney o prueba-T.

4.2.Cambios en el porcentaje de las principales subpoblaciones de linfocitos B circulantes en sangre periférica.

La expresión diferencial de las moléculas CD27 e IgD en la superficie de células CD19+ permite definir 4 grandes subpoblaciones de linfocitos B: CD27+IgD+, CD27+IgD-, CD27-IgD+ y CD27-

IgD- (Figura 7A). El análisis de estas subpoblaciones evidenció una reducción significativa en el porcentaje de células CD19+CD27+IgD- y CD19+CD27+IgD+ y un aumento significativo en las células CD19+CD27-IgD+ en los individuos infectados respecto de los controles ($p < 0,05$). En cambio, el porcentaje de células CD19+CD27-IgD- en los individuos infectados fue similar al de los controles (Figura 7B). Este análisis reveló además una reducción significativa de las células CD19+CD27+ totales en los individuos infectados respecto de los controles, tanto en términos de proporciones como de números absolutos (Tabla 2), sugiriendo un compromiso particular de este compartimiento celular a consecuencia de la infección crónica.

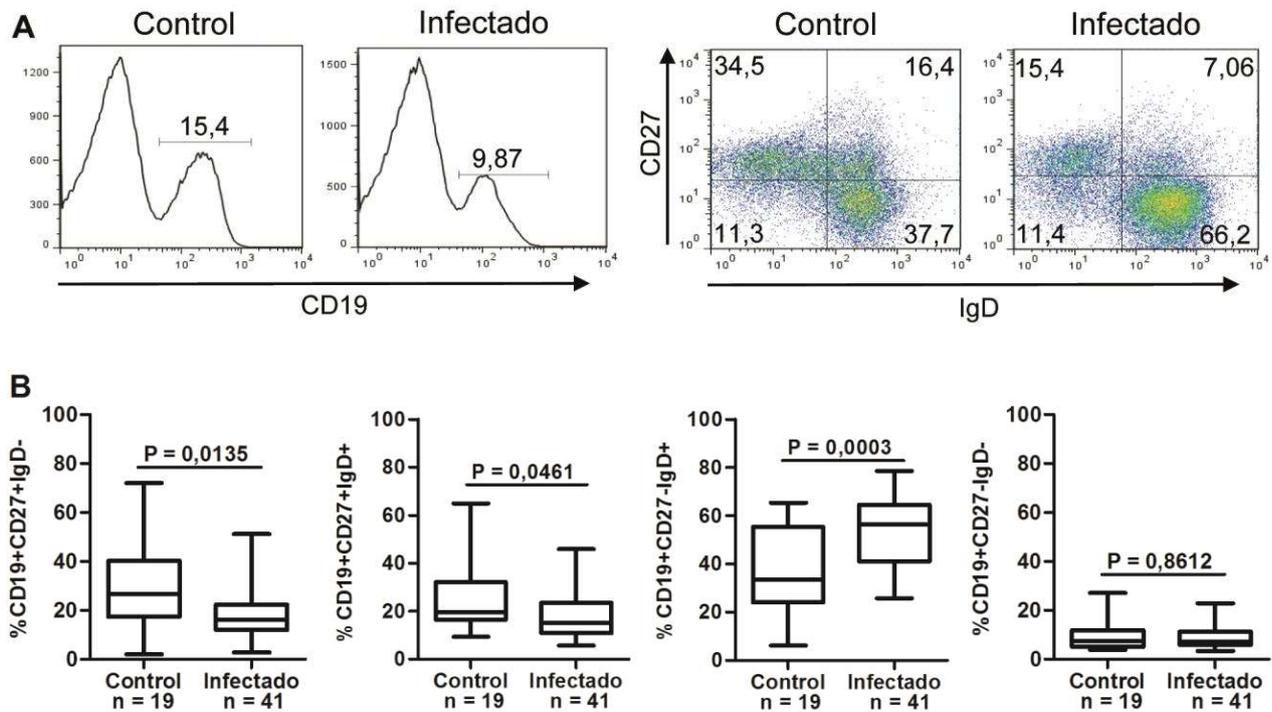


Figura 7. Distribución de subpoblaciones mayores de linfocitos B en individuos con infección crónica por *Trypanosoma cruzi*. (A) Estrategia de análisis utilizada para evaluar la expresión de los marcadores CD19, CD27 e IgD en PBMC de controles sanos e individuos infectados por citometría de flujo. Los números representan el porcentaje dentro de cada región. (B) Porcentaje de linfocitos B definidos en base a la expresión diferencial de CD27 e IgD. Gráfico de cajas con bigote (mínimo a máximo). Análisis estadístico: prueba de Mann-Whitney o prueba-T.

4.3.Linfocitos B de memoria.

Los linfocitos B de memoria son frecuentemente identificados en base a la expresión de CD27 y ausencia de expresión de IgD en la superficie de células CD19+ (Jacquot S y col., 1997; Agematsu K y col., 1995; Sanz I y col., 2008; Tangye SG y Tarlinton DM, 2009; Pérez-Andrés M y col., 2010). Sin embargo, las subpoblaciones definidas de esta manera están compuestas por diferentes tipos celulares, algunos de los cuales han sido caracterizados desde el punto de vista fenotípico, molecular y funcional (Agematsu K y col., 1997; Tangye SG y col., 2003a,b; Wirths S y Lanzavecchia A, 2005; Fecteau JF y col., 2006; Weller S y col., 2001, 2004; Good KL y col, 2009; Sims GP y col., 2005). Por ejemplo, la expresión de IgG en la superficie de células CD19+ identifica a los linfocitos B de memoria. En contraste, la molécula IgM es expresada en la superficie de linfocitos B en diferentes estadios de maduración y diferenciación (desde linfocitos inmaduros hasta linfocitos de memoria y células plasmáticas), por lo que debe ser analizada en conjunto con otros marcadores (como por ejemplo IgD) (Berkowska MA y col., 2011; Reynaud CA y col., 2012; Weller S y col., 2012).

Para evaluar la contribución relativa de distintos tipos de células de memoria en el perfil fenotípico del compartimiento celular B, en este trabajo se analizó la expresión de IgG en la superficie de células CD19+ circulantes en sangre periférica (Figura 8A). Los resultados de este análisis mostraron que el porcentaje de células CD19+IgG+ en los individuos infectados fue significativamente menor que en los controles ($p < 0,05$; Figura 8B). La expresión diferencial de CD27 en la población de células CD19+IgG+IgD- nos permite distinguir 2 subpoblaciones de linfocitos B de memoria IgG+: memoria clásica (CD27+IgD-) y memoria CD27-IgD- (doble negativa) (Fecteau JF y col., 2006; Berkowska MA y col., 2011; Cagigi AL y col., 2009; Wu YCD y col., 2011).

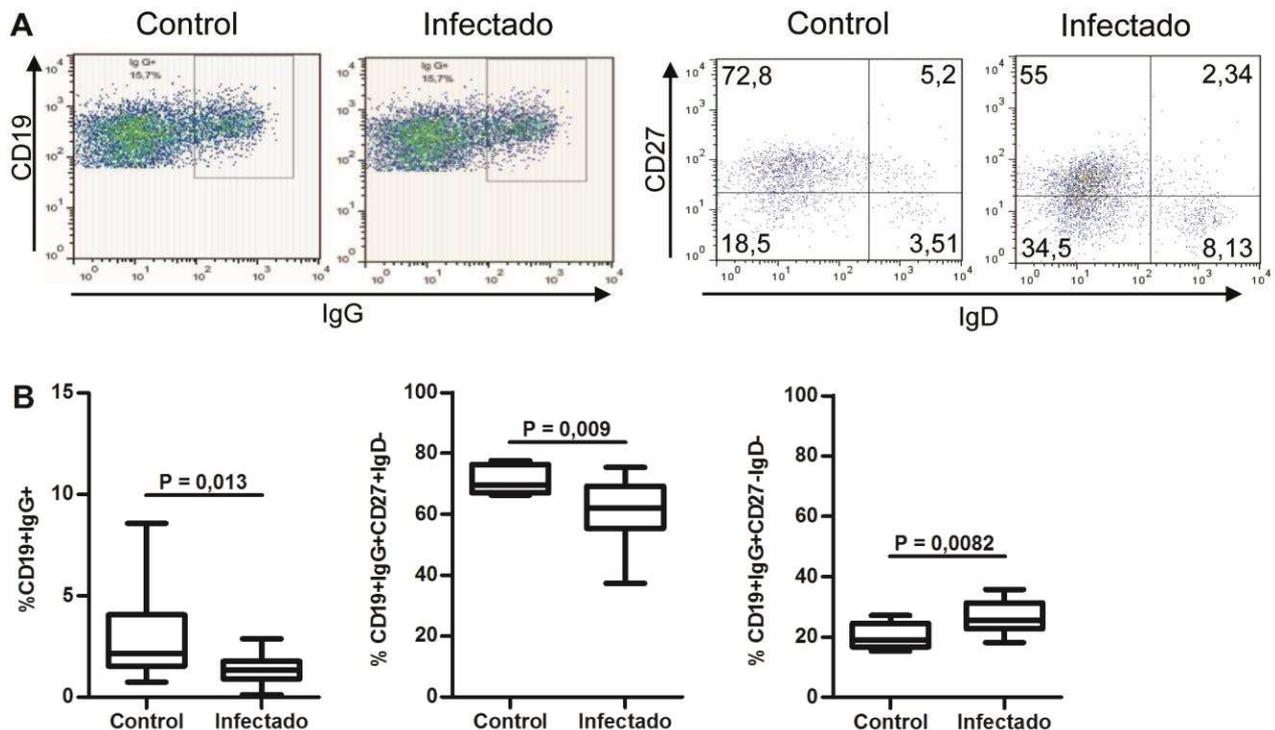


Figura 8. Alteración de linfocitos B de memoria IgG⁺ en individuos infectados por *Trypanosoma cruzi*. (A) Estrategia utilizada para evaluar subpoblaciones de linfocitos B de memoria IgG⁺ en PBMC por citometría de flujo. Los números representan el porcentaje dentro de cada región. (B) Subpoblaciones de linfocitos B de memoria IgG⁺ en individuos infectados (n= 18) y controles (n= 8). Gráfico de cajas con bigote (mínimo a máximo). Análisis estadístico: prueba de Mann-Whitney o prueba-T.

En los individuos infectados se observó disminución del porcentaje de células CD19+IgG+CD27+IgD⁻ y aumento del porcentaje de células CD19+IgG+CD27-IgD⁻, respecto de los controles ($p < 0,05$; Figura 8B). En conjunto, estos resultados indican que la infección crónica por *T. cruzi* afecta diferencialmente los dos subtipos de linfocitos B de memoria IgG⁺.

La expresión diferencial de IgM y CD27 en células que no expresan el marcador IgD nos permite definir 3 tipos de linfocitos B de memoria: células CD19+IgM+CD27+IgD⁻ (memoria IgM), células CD19+IgM+CD27-IgD⁻ (memoria IgM doble negativa) y células CD19+IgM-CD27+IgD⁻ (memoria con cambio de isotipo, IgG o IgA) (Figura 9A). En los individuos infectados con *T. cruzi*,

el porcentaje de linfocitos B de memoria IgM y de memoria con cambio de isotipo fue significativamente menor que en los controles ($p < 0,05$), mientras que el porcentaje de células CD19+IgM+CD27-IgD- fue similar entre ambos grupos (Figura 9B).

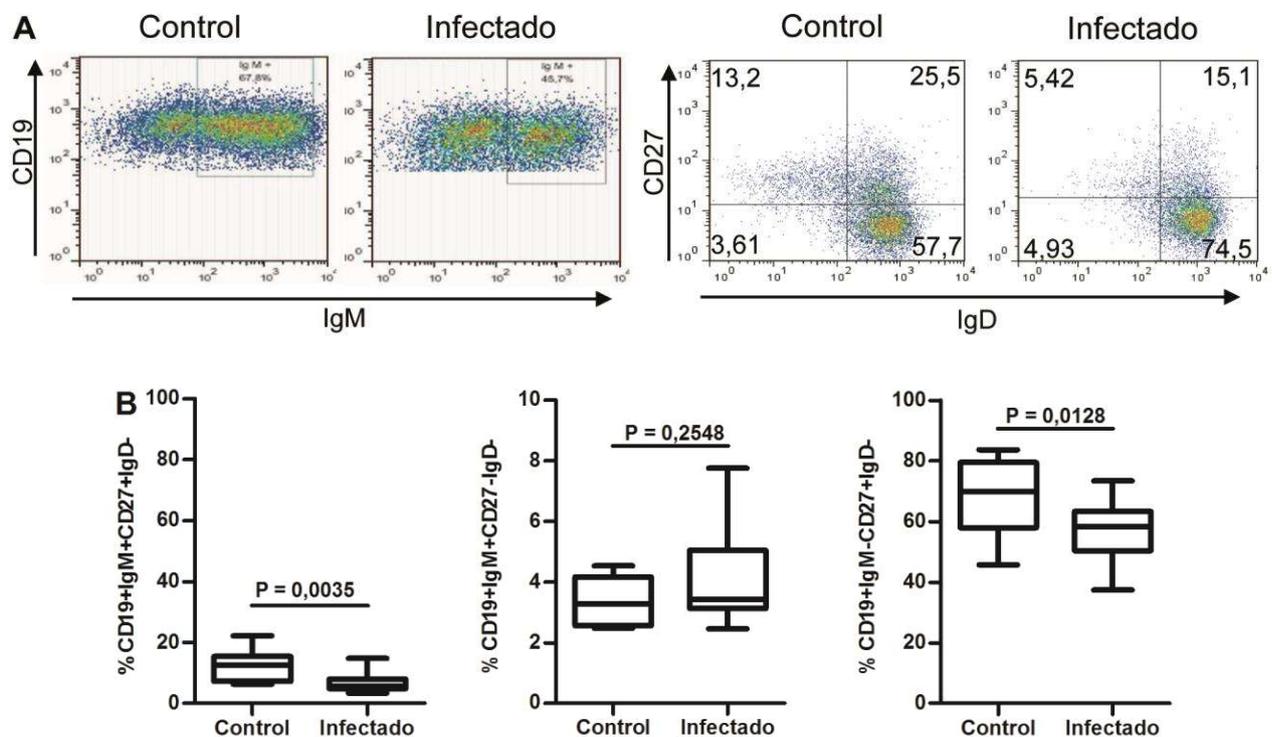


Figura 9. Alteración de células B de memoria IgM+ y con cambio de isotipo. (A) Estrategia de análisis utilizada para evaluar la expresión de los marcadores CD19, CD27 IgM e IgD en PBMC de controles sanos e individuos con enfermedad de Chagas crónica por citometría de flujo. Los números representan el porcentaje dentro de cada región. (B) Porcentaje de células en subpoblaciones de linfocitos B definidas en base a la expresión diferencial de los marcadores indicados para 8 controles sanos y 18 individuos infectados. Gráfico de cajas con bigote (mínimo a máximo). Análisis estadístico: prueba de Mann-Whitney o prueba-T.

Finalmente, se analizó la relación entre las distintas subpoblaciones de memoria B y la población mayor CD27+IgD-, hallándose correlación positiva entre el porcentaje de células IgG+CD27+IgD-, IgM+CD27+IgD- e IgM-CD27+IgD- y el porcentaje de células CD19+CD27+IgD-, indicando que los 3 subtipos celulares de memoria contribuyen a la constricción de la población mayor (Figura 10

y 11). Por otro lado, se detectó que la proporción de células CD19+IgG+CD27+IgD- se correlacionó negativamente con la proporción de células CD19+IgG+CD27-IgD-, tanto en individuos infectados como controles (Figura 10).

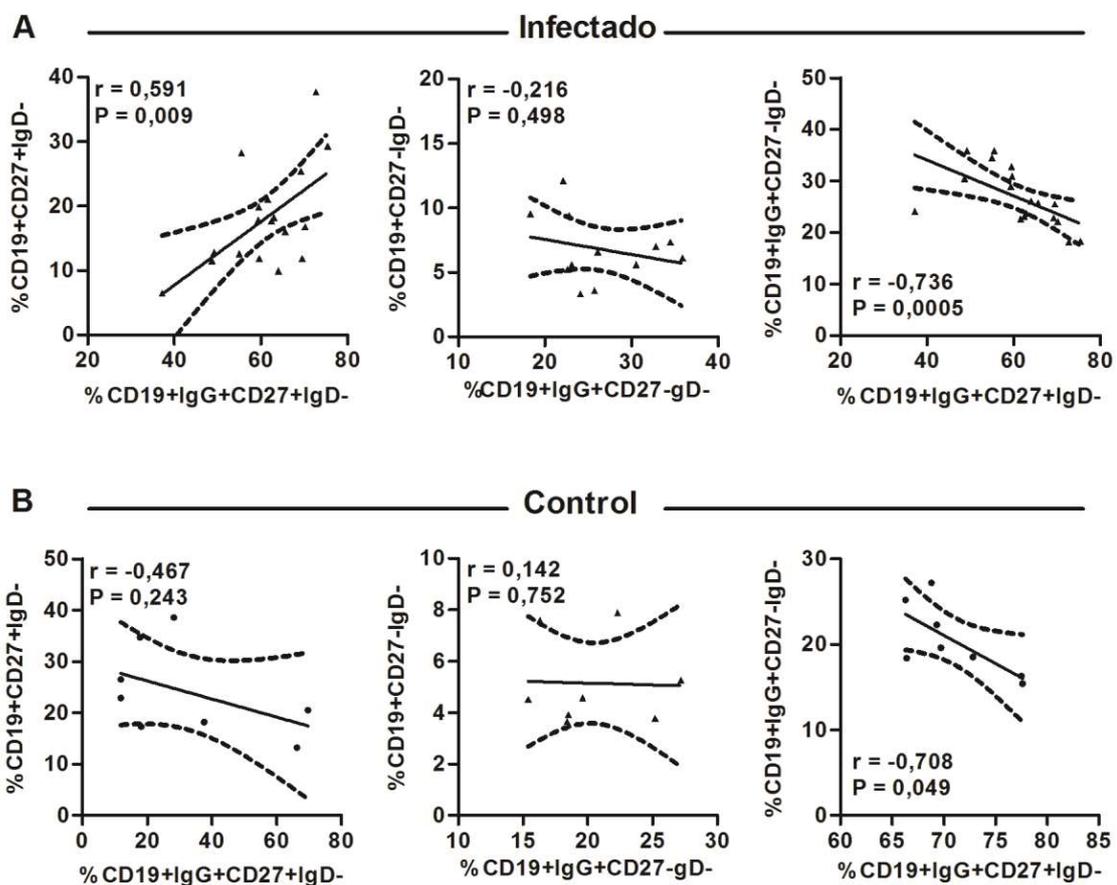


Figura 10. Correlación entre subpoblaciones de linfocitos B de memoria IgG+ y poblaciones mayores CD19+CD27+IgD- y CD19+CD27-IgD- (A) en individuos infectados y (B) controles. El análisis estadístico se realizó con la prueba de correlación de Spearman o Pearson.

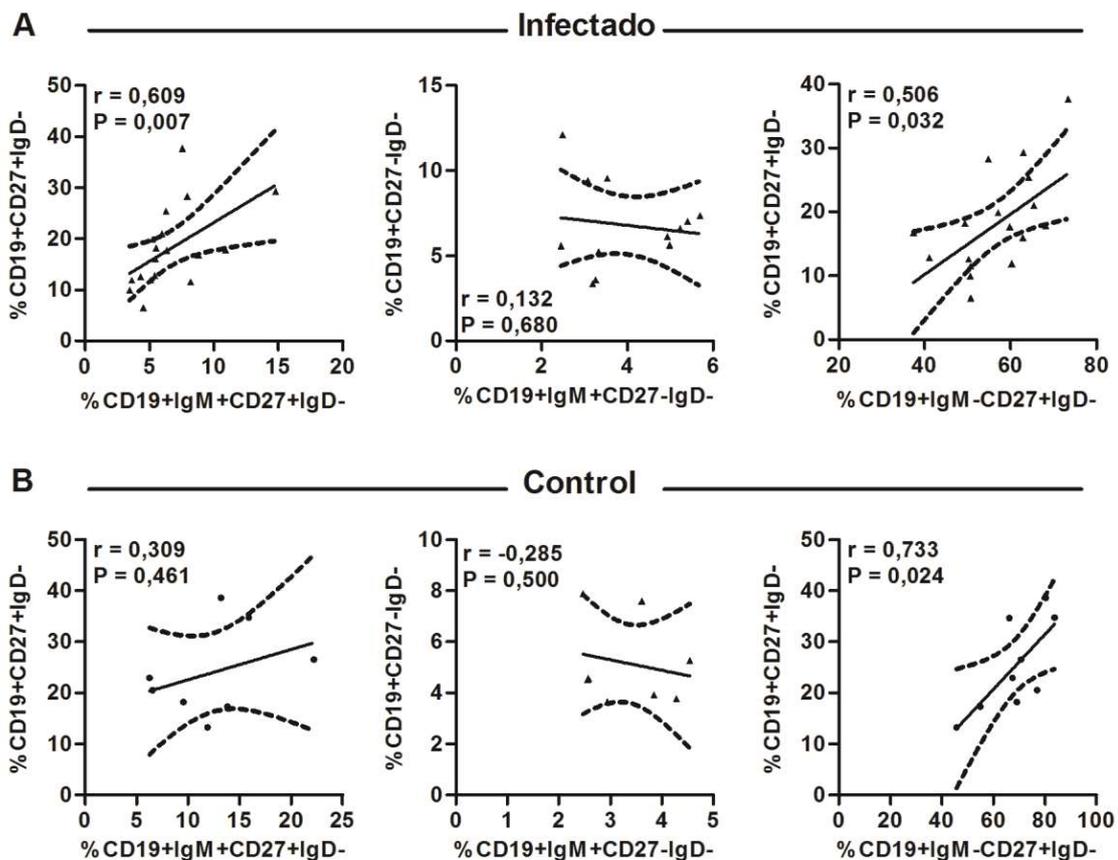


Figura 11. Correlación entre subpoblaciones de linfocitos B de memoria IgM⁺ y con cambio de isotipo y poblaciones mayores CD19+CD27+IgD⁻ y CD19+CD27-IgD⁻ (A) en individuos infectados y (B) controles. El análisis estadístico se realizó con la prueba de correlación de Spearman o Pearson.

4.4. Análisis de la subpoblación de células B IgM⁺CD27+IgD⁺ en la infección crónica por *Trypanosoma cruzi*.

El fenotipo IgM⁺CD27+IgD⁺ es compartido por los linfocitos B de zona marginal esplénica T-independiente (CD21⁺CD23⁻CD24⁺CD38^{+/-}), linfocitos B originados en el CG (CD38⁺⁺), linfocitos B-1 (CD43⁺CD70⁻) y linfocitos B regulatorios (CD24^{hi}CD25⁺CD38⁺IL-10⁺) (Weller S y col., 2004 y 2012; Sanz I y col., 2008; Seifert M y col., 2009; Griffin DO y col., 2011; Iwata Y y col., 2011). El análisis de la población CD19+IgM+CD27+IgD+ en este trabajo mostró proporciones similares entre los individuos infectados por *T. cruzi* y controles (porcentaje medio \pm DS = 20,90 \pm

11,01, $n= 18$, y $26,76 \pm 10,48$, $n= 8$, respectivamente) (Figura 9A). La proporción de células $CD19+IgM+CD27+IgD+$ se correlaciona positivamente con la proporción de células $CD19+CD27+IgD+$ en los individuos infectados ($r = 0,7273$ y $P = 0,0074$).

4.5.Efecto de la infección crónica por *Trypanosoma cruzi* sobre las células B vírgenes.

La expresión diferencial de IgM y CD27 en las células $CD19+$ que expresan IgD en la superficie permite la identificación de los linfocitos B vírgenes ($CD19+IgM+CD27-IgD+$) (Fig. 12A). El porcentaje de células $CD19+IgM+CD27-IgD+$ en los individuos infectados con *T. cruzi* fue significativamente mayor respecto de los controles ($p<0,05$; Figura 12A). El porcentaje de células $CD19+IgM+CD27-IgD+$ se correlacionó con el porcentaje de células $CD19+CD27-IgD+$, tanto en individuos infectados como controles, indicando que los linfocitos B vírgenes contribuyen al incremento de la población mayor de células $CD27-IgD+$ (Figura 7B).

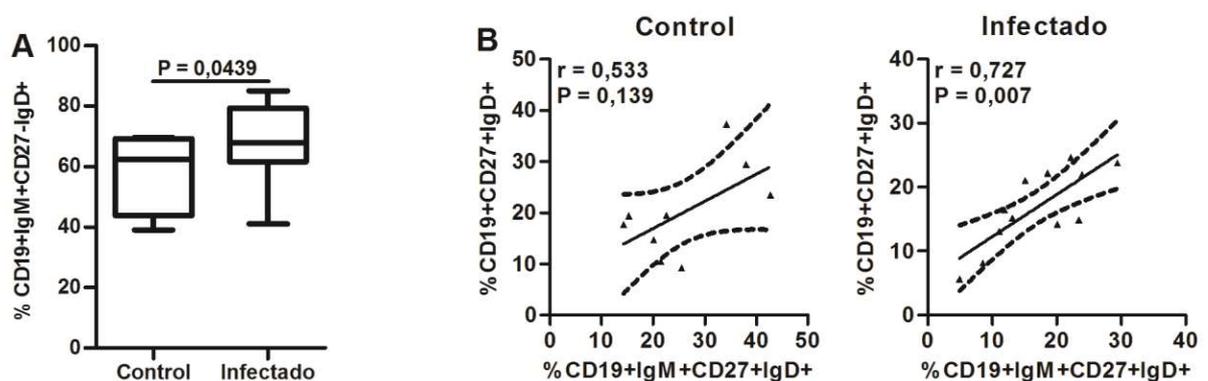


Figura 12. La infección crónica por *Trypanosoma cruzi* provoca un aumento de los linfocitos de B vírgenes. (A) Porcentaje de células $CD19+IgM+CD27-IgD+$ en 8 controles y 18 individuos infectados. Gráfico de cajas con bigote (mínimo a máximo). Análisis estadístico: prueba de prueba-T. **(B)** Correlación entre el porcentaje de células $CD19+IgM+CD27-IgD+$ y células $CD19+CD27-IgD+$. El análisis estadístico se realizó con la prueba de correlación de Spearman.

4.6.Reducción de las células plasmáticas terminalmente diferenciadas en infección crónica por *Trypanosoma cruzi*

Las células plasmáticas son células de diferenciación terminal que pierden la capacidad proliferativa, expresan la molécula de adhesión sindecan-1 (CD138) y CD27, con poca o ninguna expresión de inmunoglobulina de superficie (Smith KG y col., 1996; Wirths S and Lanzavecchia A y col., 2005; Caraux A y col., 2010) (Figura 13A). El análisis de células CD19+CD27+CD138+ por citometría de flujo en mostró una disminución significativa en el porcentaje de células plasmáticas en los individuos infectados con *T. cruzi* respecto de los controles ($p < 0,05$; Figura 13B). Luego se estimó el número absoluto de células CD19+CD27+CD138+ observándose una disminución significativa del número absoluto de células plasmáticas en los individuos infectados respecto de los controles (Figura 13B).

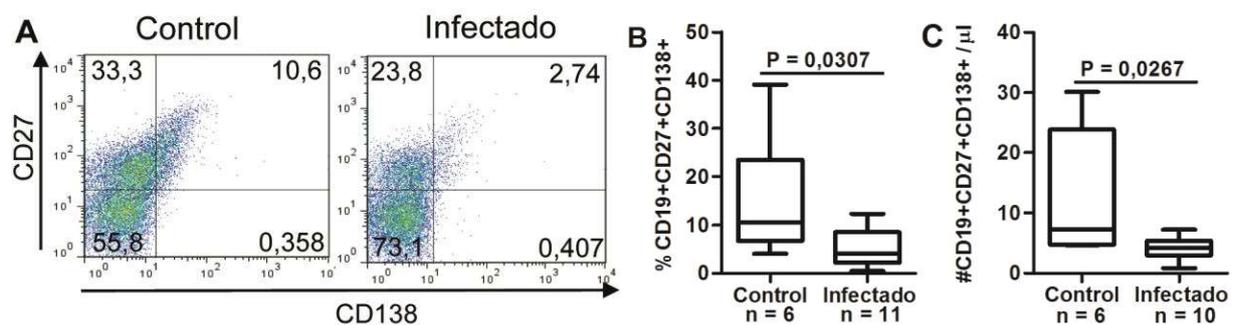


Figura 13. Reducción de las células plasmáticas terminalmente diferenciadas en infección crónica por *Trypanosoma cruzi*. (A) Estrategia de análisis utilizada para evaluar la expresión de los marcadores CD19, CD27 y CD138 en PBMC de controles sanos e individuos con enfermedad de Chagas crónica por citometría de flujo. Los números representan el porcentaje dentro de cada región. (B y C) Gráfico de cajas con bigote (mínimo a máximo) que muestran el porcentaje y número absoluto de células CD19+CD27+CD138+ para individuos infectados y controles sanos. Gráfico de cajas con bigote (mínimo a máximo). Análisis estadístico: prueba de Mann-Whitney.

4.7.Linfocitos B inmaduros/transicionales en la infección crónica por *Trypanosoma cruzi*.

Para evaluar si la infección por *T. cruzi* afecta estadios tempranos de maduración de los linfocitos

B, se evaluó la expresión de CD10, el marcador clásico de células de médula ósea, en las células CD19+ de sangre periférica (Figura 14A). Los resultados mostraron que el porcentaje de células CD19+CD10+ en los individuos infectados es similar al de los controles (Figura 14B). Tampoco se

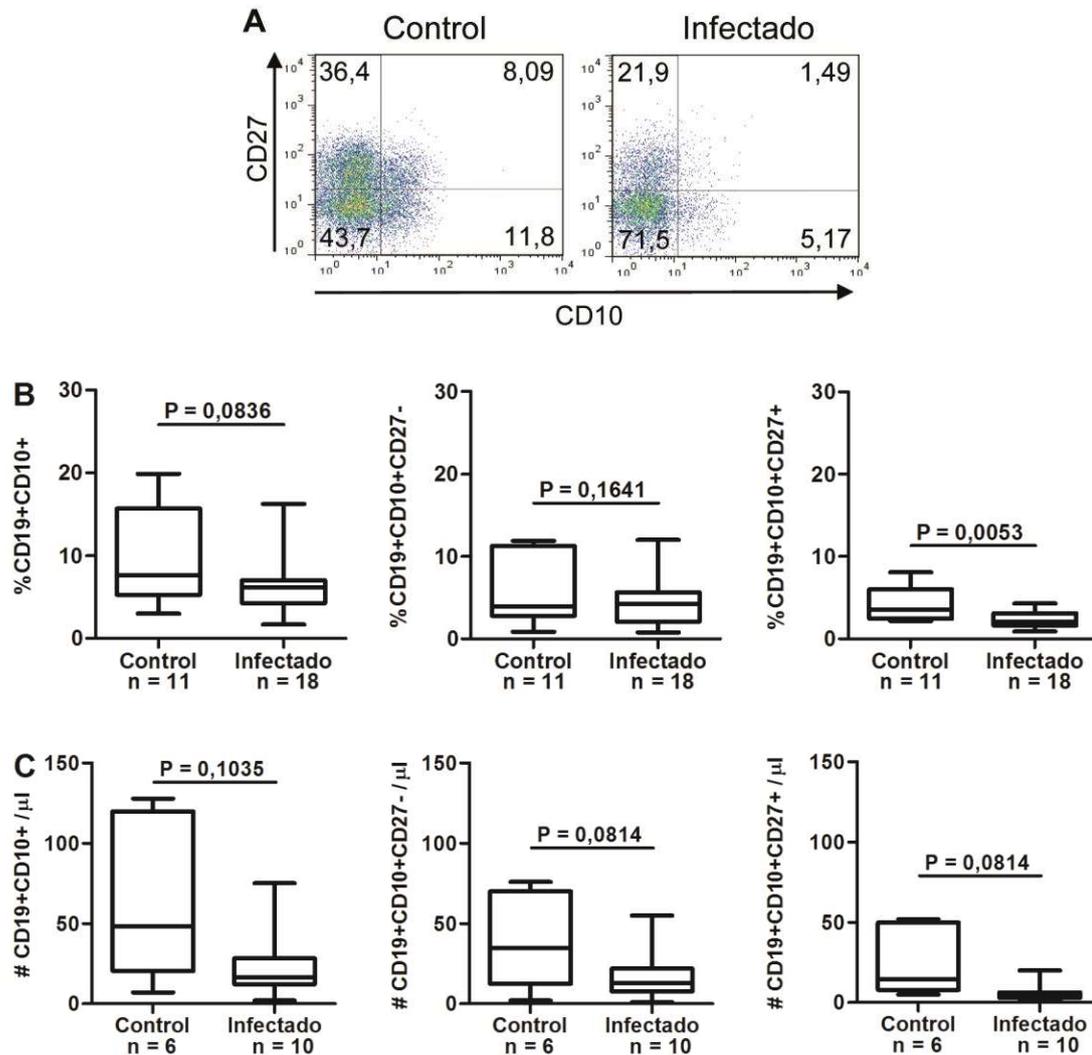


Figura 14. La infección crónica por *Trypanosoma cruzi* provoca una disminución de los linfocitos pre-B CD10+CD27+. (A) Expresión de CD27 y CD10 en linfocitos CD19+ de controles e individuos infectados por citometría de flujo. Los números representan el porcentaje dentro de cada región. (B y C) Gráfico de cajas con bigote (mínimo a máximo) que muestran el porcentaje y número absoluto de células que expresan los marcadores indicados para individuos infectados y controles sanos. Gráfico de cajas con bigote (mínimo a máximo). Análisis estadístico: prueba de Mann-Whitney o prueba-T.

observaron diferencias significativas en el número absoluto de células CD19+CD10+ entre los individuos infectados y controles. Luego se incorporó el marcador CD27 en el análisis, observándose una reducción significativa en términos de porcentaje y número absoluto de células CD19+CD10+CD27+ en los individuos infectados respecto de los controles, mientras que no se detectaron diferencias en la población CD19+CD10+CD27- entre ambos grupos (Figura 14B y C).

4.8. Distribución de subpoblaciones de células B en relación al estadio de la enfermedad de Chagas crónica.

Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que el perfil fenotípico de linfocitos T CD4+ y CD8+ en individuos con infección crónica por *T. cruzi* varía en relación al grado de compromiso cardíaco. Es posible que un fenómeno similar pueda ocurrir en la población de linfocitos B de sangre periférica. Para evaluar la relación entre el perfil fenotípico de linfocitos B y el estadio de la enfermedad de Chagas crónica, las proporciones de las subpoblaciones de células CD19+ fueron analizadas en relación a la clasificación clínica de Kuschnir (Kuschnir y col., 1985). Los resultados mostraron un porcentaje significativamente menor de células CD19+CD27+ en los individuos del grupo G0 (porcentaje medio \pm DS = $32,43 \pm 13,69$; n = 22) respecto de los individuos del grupo G2 (porcentaje medio \pm DS = $48,60 \pm 9,64$; n = 6; $p < 0,05$), con valores intermedios en los individuos del grupo G1 (porcentaje medio \pm DS = $37,30 \pm 12,94$; n = 20). No se detectaron diferencias significativas en las proporciones de ninguna de las otras subpoblaciones celulares CD19+ evaluadas entre los diferentes grupos de individuos infectados. Sin embargo, el análisis de las subpoblaciones celulares para cada grupo de individuos infectados y controles reveló aumento de células CD19+CD27-IgD+ en los individuos de los grupos G0 y G1 respecto de los controles (Figura 15A). Por otro lado, se detectó disminución de las células B IgG+CD27+IgD- y IgM-CD27+IgD- en los individuos del grupo G0 y G1 en comparación con los controles, respectivamente (Figura 15B).

En conjunto, estos datos sugieren que la infección por *T. cruzi* provoca cambios en la distribución de algunas subpoblaciones de linfocitos B CD27+ que se manifiestan previo al desarrollo de las lesiones cardíacas que caracterizan a la miocardiopatía chagásica crónica.

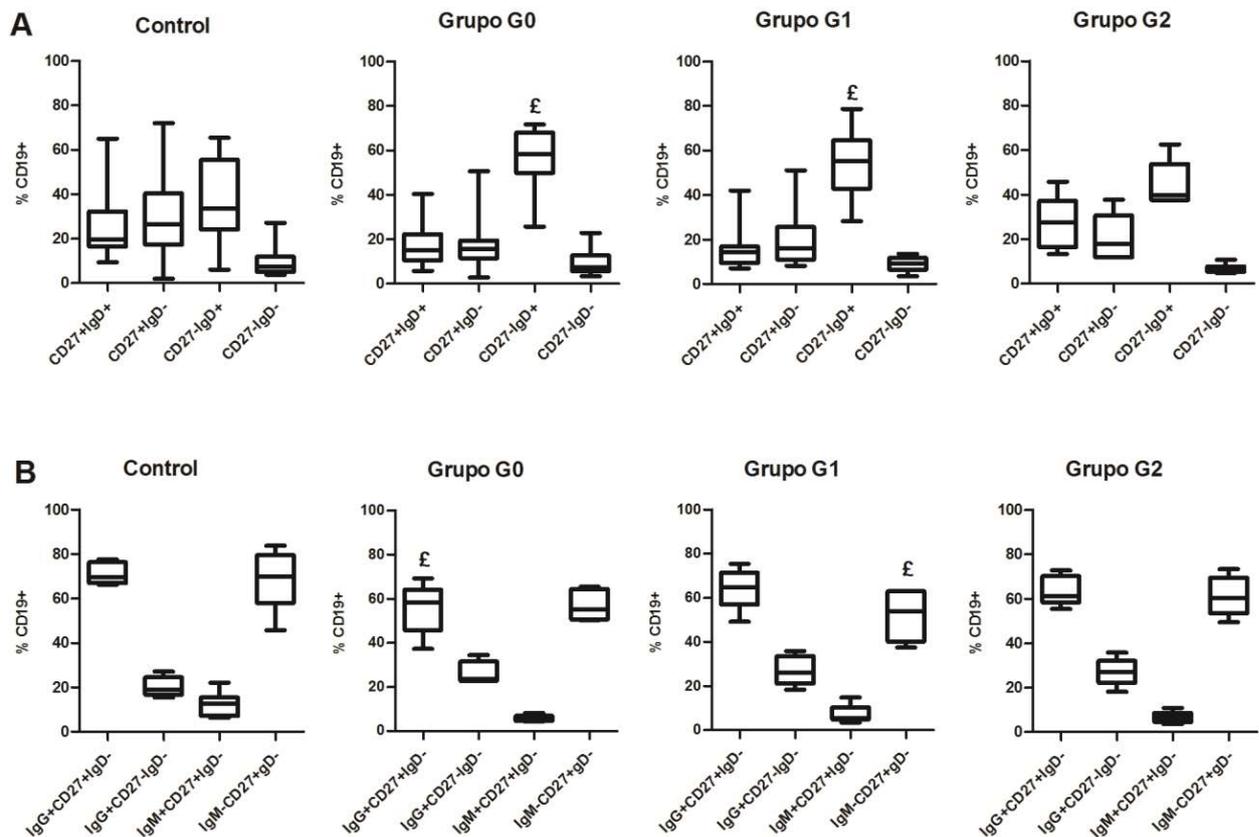


Figura 15. Perfil fenotípico de subpoblaciones de linfocitos B en diferentes estadios clínicos de la enfermedad de Chagas crónica. Los individuos infectados fueron agrupados de acuerdo a la clasificación clínica de Kuschnir en G0, G1 y G2. **(A)** Subpoblaciones principales de células B definidas por los marcadores CD27 e IgD. **(B)** Subpoblaciones de células B de memoria definidas por los marcadores CD27, IgD, IgM e IgG. Análisis estadístico: ANOVA seguido por Bonferroni o Kruskal-Wallis seguido por Dunn. £ $p < 0,05$ vs grupo control.

4.9. Análisis de linfocitos T CD4+ en la infección crónica por *Trypanosoma cruzi*.

Las proporciones y números absolutos de células T CD4+ circulantes en sangre periféricas de los individuos infectados fue similar a los observados en los controles (Figura 16A y B). En el presente estudio se analizó la población de linfocitos T CD4+ de memoria en base a la expresión del marcador CD45RO. El porcentaje de linfocitos T CD4+ de memoria total (CD45RO+) fue significativamente mayor en los individuos infectados respecto de los controles ($p < 0,05$). En cambio, el número absoluto de células T CD4+CD45RO+ fue similar entre ambos grupos. Luego se evaluaron subpoblaciones de memoria T CD4+ temprana y diferenciada en base a la expresión diferencial de CD27, detectándose aumento del porcentaje de células de memoria T CD4+ diferenciada (CD45RO+CD27-) en los individuos infectados, mientras que los porcentajes de células de memoria T CD4+ temprana (CD45RO+CD27+) fueron similares entre ambos grupos. En cambio, el análisis del número absoluto mostró disminución de células T CD4+CD45RO+CD27+, y aumento de células T CD4+CD45RO+CD27- en los individuos infectados ($p < 0,05$; Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ totales

Fenotipo	Control	Infectado	P
CD4+CD45RO+	57,53 ± 10,3 [460 ± 151]	69,85 ± 12,5 [534 ± 194]	0,042 0,345
CD4+CD45RO+CD27+	47,84 ± 8,4 [148 ± 36]	46,70 ± 10,9 [75 ± 52]	0,814 0,013
CD4+CD45RO+CD27-	9,68 ± 5,17 [52 ± 51]	23,15 ± 10,61 [137 ± 65]	0,006 0,02

Los datos representan el porcentaje medio ± DS de células de cada fenotipo (n= 7 controles y 12 infectados) y el [número absoluto medio ± DS] (n= 6 controles y 8 infectados).

Análisis estadístico: prueba de Mann-Whitney o prueba-T.

El análisis de las células T CD4+CD27+ totales mostró una disminución significativa de la proporción de las mismas en los individuos infectados respecto de los controles ($p < 0,05$; Figura 16A). La proporción de células T CD4+CD27+ se correlacionó positivamente con la proporción de células B CD19+CD27+ descrita anteriormente (Tabla 2), sugiriendo que la disminución de las células T CD4+ activadas podría inducir, al menos en parte, los cambios en la distribución de las células B CD27+ descrita anteriormente (Figura 16C).

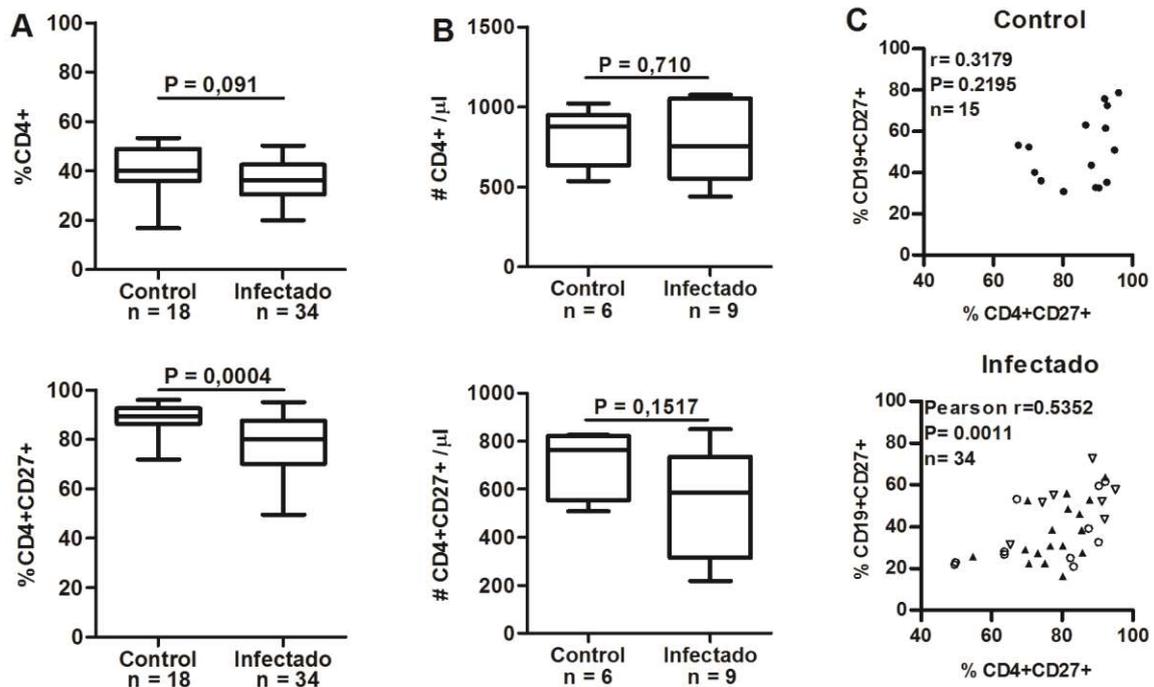


Figura 16. Disminución de células T CD4+CD27+ en la infección crónica por *Trypanosoma cruzi*. (A) Porcentaje y (B) número absoluto de células CD4+ y CD4+CD27+ en individuos infectados y controles. Gráfico de cajas con bigote (mínimo a máximo). Análisis estadístico: prueba de Mann-Whitney o prueba-T. (C) Correlación entre el porcentaje de células CD19+CD27+ y CD4+CD27+ en individuos con diferente grado de disfunción cardíaca (G0, círculos vacíos; G1, triángulos llenos; G2, triángulos vacíos; ver Materiales y Métodos). Análisis de correlación de Pearson o Spearman.

4.10. Niveles séricos de CD27 soluble en individuos con enfermedad de Chagas crónica.

El CD27 es un homodímero transmembrana tipo I de 50-55 kDa expresado en la superficie de células T y B activadas y su proteólisis genera una molécula soluble estructuralmente relacionada de 28-32 kDa (van Lier RAW y col., 1987). Los niveles de sCD27 en fluidos corporales han sido frecuentemente utilizados para monitorear el estado de activación inmunológica sistémica en infecciones virales crónicas, enfermedades autoinmunes y linfomas de células B (Portegies P y col., 1993; Font J y col., 1996; Widney D y col., 1999; Bohnhorst JO y col., 2002; Atlas A y col., 2004, Mohsenzadegan M y col., 2014). En este trabajo se determinó el nivel sérico de sCD27 por ELISA

en el suero de individuos infectados con diferente grado de compromiso cardíaco, observándose que los individuos infectados del grupo G2 muestran niveles significativamente más altos comparados con los controles sanos y los otros grupos clínicos (Figura 17). No se detectó correlación entre los niveles de sCD27 y el porcentaje de células CD19+CD27+ o CD4+CD27+ en individuos infectados ni controles. Por otro lado, el análisis de los datos por regresión lineal mostró una tendencia positiva a medida que el compromiso cardíaco fue más severo, sugiriendo su potencial utilidad como marcador inmunológico de la progresión de la enfermedad de Chagas ($R^2 = 0,1721$, $P = 0,0070$; $1/\text{pendiente} = 0,02867$).

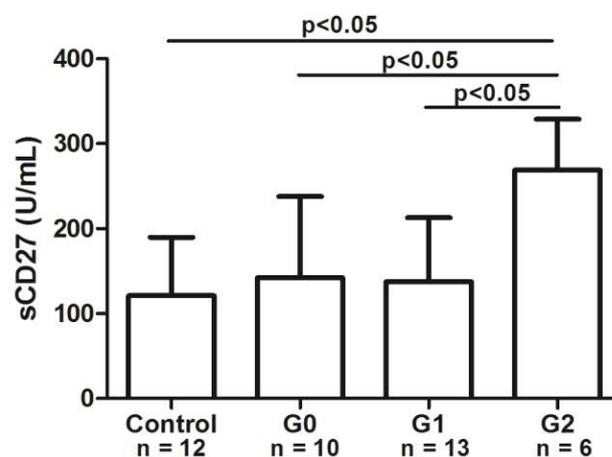


Figura 17. Comparación de los niveles séricos de sCD27 en individuos infectados crónicamente con *Trypanosoma cruzi*. Los niveles de sCD27 sérico fueron medidos por ELISA en individuos en estadio G0, G1, G2, y controles sanos (ver Materiales y Métodos). Las barras representan la media y desvío estándar para cada grupo. El análisis estadístico se realizó por medio del test de ANOVA seguido por Bonferroni.

4.11. Impacto de la infección crónica sobre la expresión de marcadores de co-señalización y activación en células CD19+ y CD4+ de sangre periférica.

Las células del sistema inmune expresan distintos receptores o ligandos en la superficie celular mediante los cuales pueden detectar y responder a señales del medio ambiente. Los linfocitos B dependen de señales generadas por los linfocitos T CD4+ para su proliferación, supervivencia, cambio de isotipo, formación del centro germinal, generación de células de memoria, diferenciación a células plasmáticas y producción de IgG, funciones esenciales para una correcta respuesta B dependiente de los linfocitos T CD4+ (Taylor JJ y col., 2012; MacHeyzer-Williams M y col., 2011; Shipkova M y Weiland E, 2012; Croft M y col., 2012).

Expresión de CD40 y CD154. Los linfocitos B tienen la capacidad de captar e internalizar partículas antigénicas, las cuales son procesadas en su interior; los péptidos generados son acoplados a moléculas de MHC de clase II y presentados en la superficie celular (Lanzavecchia A, 1985). El reconocimiento del complejo péptido-MHC-II por los linfocitos T CD4+ colaboradores complementarios para dicho antígeno, induce la activación de los linfocitos B a través de la interacción del ligando CD154 (CD40L) con el receptor CD40 (Clark EA y Ledbetter JA, 1994; Yuseff MI y col., 2013). Como resultado de esta estimulación, los linfocitos B pueden proliferar, cambiar el isotipo de Ig y diferenciarse a células plasmáticas con capacidad de secretar anticuerpos específicos. En este trabajo se evaluó la expresión ex-vivo de CD40 en células CD19+ periféricas en individuos infectados con *T. cruzi* en estadios G0 y G1, observándose aumento del porcentaje de células CD19+CD40+ en los individuos del grupo G0 respecto del grupo G1 ($p < 0,05$; Figura 18B). Sin embargo, los niveles de intensidad de fluorescencia en los grupos infectados fueron similares entre sí y respecto de los controles. El análisis de CD4+CD154+ mostró porcentajes similares entre los grupos infectados y respecto de los controles. Sin embargo, se detectaron mayores niveles de intensidad de fluorescencia de CD154 en la población de células T CD4+ en individuos del grupo G0 respecto del grupo G1 (Figura 18B).

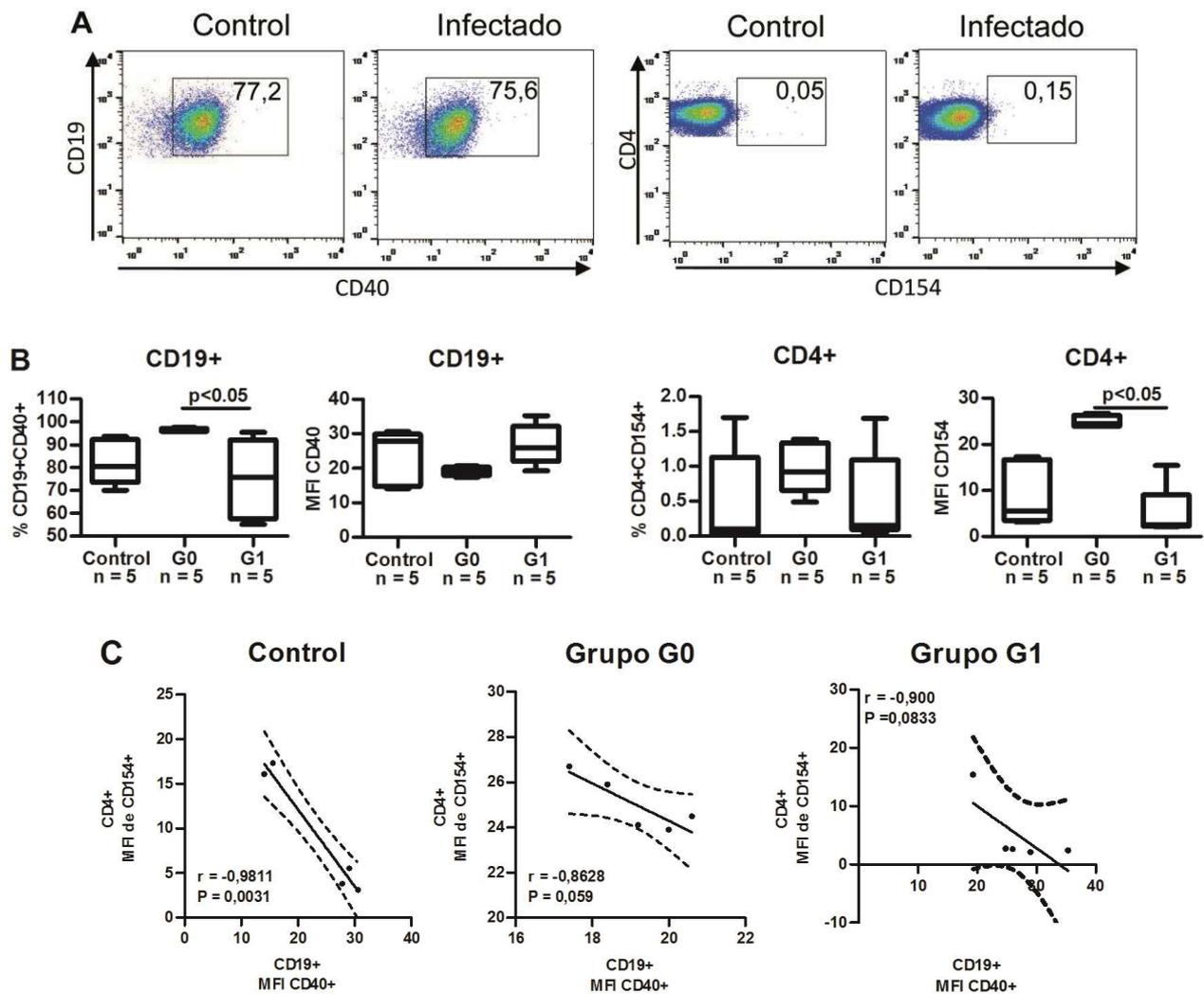


Figura 18. Células CD19+CD40+ y CD4+CD154+ en individuos con infección crónica por *Trypanosoma cruzi*. (A) Estrategia de análisis utilizada para evaluar la expresión de los marcadores CD40 y CD154 en células CD19+ y CD4+, respectivamente por citometría de flujo. Los números representan el porcentaje dentro de cada región. (B) Porcentaje e intensidad de fluorescencia media de los marcadores indicados para individuos infectados (grupo G0 y G1) y controles. Gráfico de cajas con bigote (mínimo a máximo), prueba de ANOVA seguido por Bonferroni o Kruskal-Wallis seguido por Dunn. El número de individuos analizados de cada grupo se indica en cada gráfico (C) Gráficos de correlación entre el MFI de CD40 en células CD19+ y el MFI de CD154 en células CD4+. El análisis estadístico se realizó con la prueba de correlación de Spearman o Pearson.

En el grupo control, la MFI de CD40 en células CD19⁺ se correlacionó negativamente con la MFI de CD154 en células CD4⁺. Dicha correlación no fue observada en los individuos infectados, sugiriendo una desregulación de la vía CD154/CD40 durante la infección (Figura 18C).

Expresión de CD70. El receptor CD70, ligando del receptor CD27, es expresado por linfocitos T activados, entre otros tipos celulares (Oshima H y col., 1998; Tesselaar K y col., 2003). La interacción CD70-CD27 induce la proliferación y supervivencia de las células T activadas, regulando positivamente su función efectora y diferenciación a células de memoria (Nolte MA y col., 2009). Con el objetivo de determinar si la reducción de células CD19⁺CD27⁺ se relaciona con la expresión de CD70 en los linfocitos T CD4⁺, se analizó la expresión de CD70 en subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺CD27⁺ y CD27⁻ periféricos ex-vivo (Figura 19A). Los resultados mostraron menor porcentaje de células CD4⁺CD70⁺ en los individuos infectados del grupo G0 respecto del grupo G1 y controles, y de células CD4⁺CD27⁺CD70⁺ en los individuos del grupo G0 respecto del grupo G1 ($p < 0,05$); no se detectaron diferencias en el porcentaje de células CD4⁺CD27⁻CD70⁺ entre los grupos analizados. Por otro lado, el análisis del MFI mostró una mayor expresión de CD70 en las 3 poblaciones celulares en los individuos del grupo G0 respecto del grupo G1 y controles (Figura 20), sugiriendo un estado de activación de las células T CD4⁺ periféricas previo al desarrollo de síntomas cardíacos asociados a la infección crónica por *T. cruzi*.

Expresión de CD95. La expresión de la molécula CD95 en la superficie celular es también frecuentemente utilizada para determinar el estado de activación de linfocitos B y T en relación a la evolución de la respuesta inmune (Jacobi AM y col., 2008; Shipkova M y Weiland E, 2012; Keesen TSL y col., 2012). El análisis de la expresión ex-vivo de CD95 en subpoblaciones CD27^{+/-} de linfocitos B y T CD4⁺ periféricos mostró niveles similares en todos los grupos estudiados (Figura 19B). El porcentaje de células CD95⁺ en las subpoblaciones de linfocitos B y T fueron similares en los 3 grupos analizados. Sin embargo, se observó mayor intensidad de fluorescencia de CD95 en células CD19⁺CD27⁻ de individuos del grupo G0 respecto del grupo G1 y controles ($p < 0,05$; Figura

20). Por otro lado, no se observó diferencias en los niveles de intensidad de fluorescencia de CD95 en las subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ entre los grupos de individuos infectados y respecto controles (Figura 20).

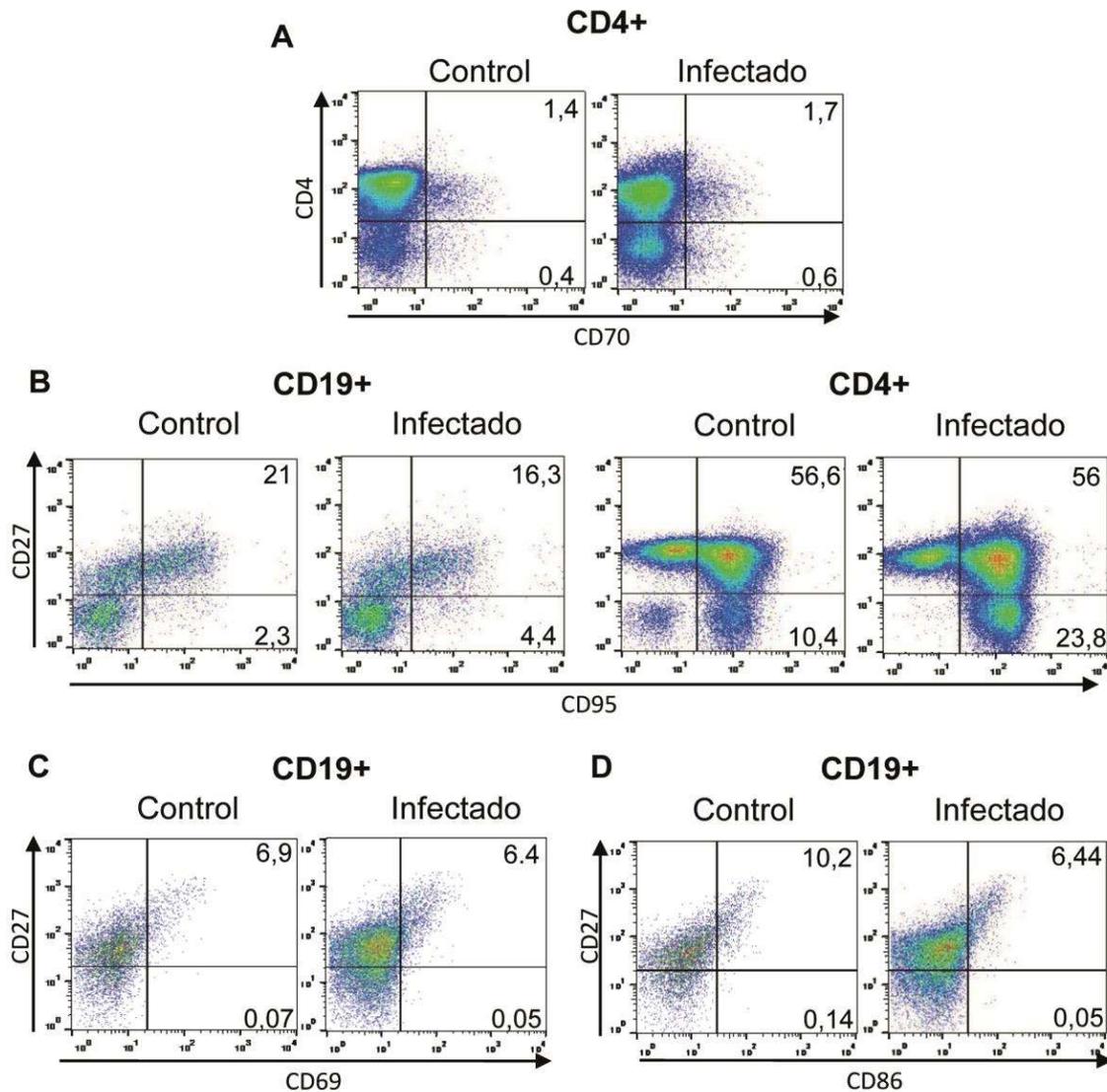


Figura 19. Expresión de marcadores de activación y co-estimulación en linfocitos B y T CD4⁺ periféricos. Estrategia de análisis utilizada para evaluar la expresión de CD27, CD69 (A), CD86 (B) y CD95 (D) en células CD19⁺, y CD27, CD70 (C) y CD95 (D) en células T CD4⁺ de controles e individuos infectados por citometría de flujo. Los números representan el porcentaje dentro de cada región.

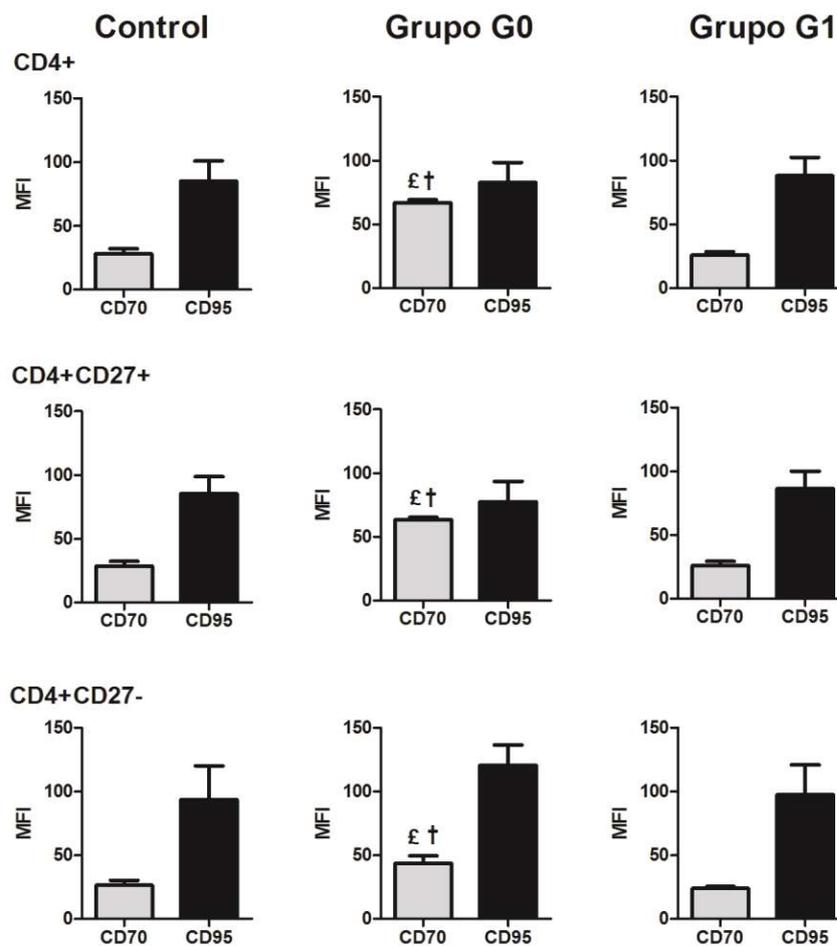


Figura 20. Expresión de marcadores de activación y co-estimulación en linfocitos B de sangre periférica. Expresión de los marcadores CD70 y CD95 en células CD4+, CD4+CD27+ y CD4+CD27- en individuos infectados con *T. cruzi* del grupo G0 y del grupo G1 y controles (5 individuos/grupo). Gráficos de barras con desvío estándar que muestran la intensidad de fluorescencia media (MFI) que expresan los diferentes marcadores indicados. El análisis estadístico se realizó por medio de la prueba de ANOVA seguido por Bonferroni o Kruskal-Wallis seguido por Dunn. £ $p < 0,05$ vs grupo control; † $p < 0,05$ vs grupo G1.

Expresión de CD69. La molécula CD69 es una glicoproteína transmembrana perteneciente a la familia de las lectinas de tipo C, que se induce rápidamente luego de la activación de linfocitos. Esta molécula funciona como un receptor de transmisión de señales en los linfocitos T, B y NK, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y plaquetas (González-Amaro R y col., 2013). El análisis de la

expresión de CD69 mostro porcentajes y MFI de CD69 en células CD19+, CD19+CD27+ y CD19+CD27- similares en individuos infectados y controles (Figura 19C y 21).

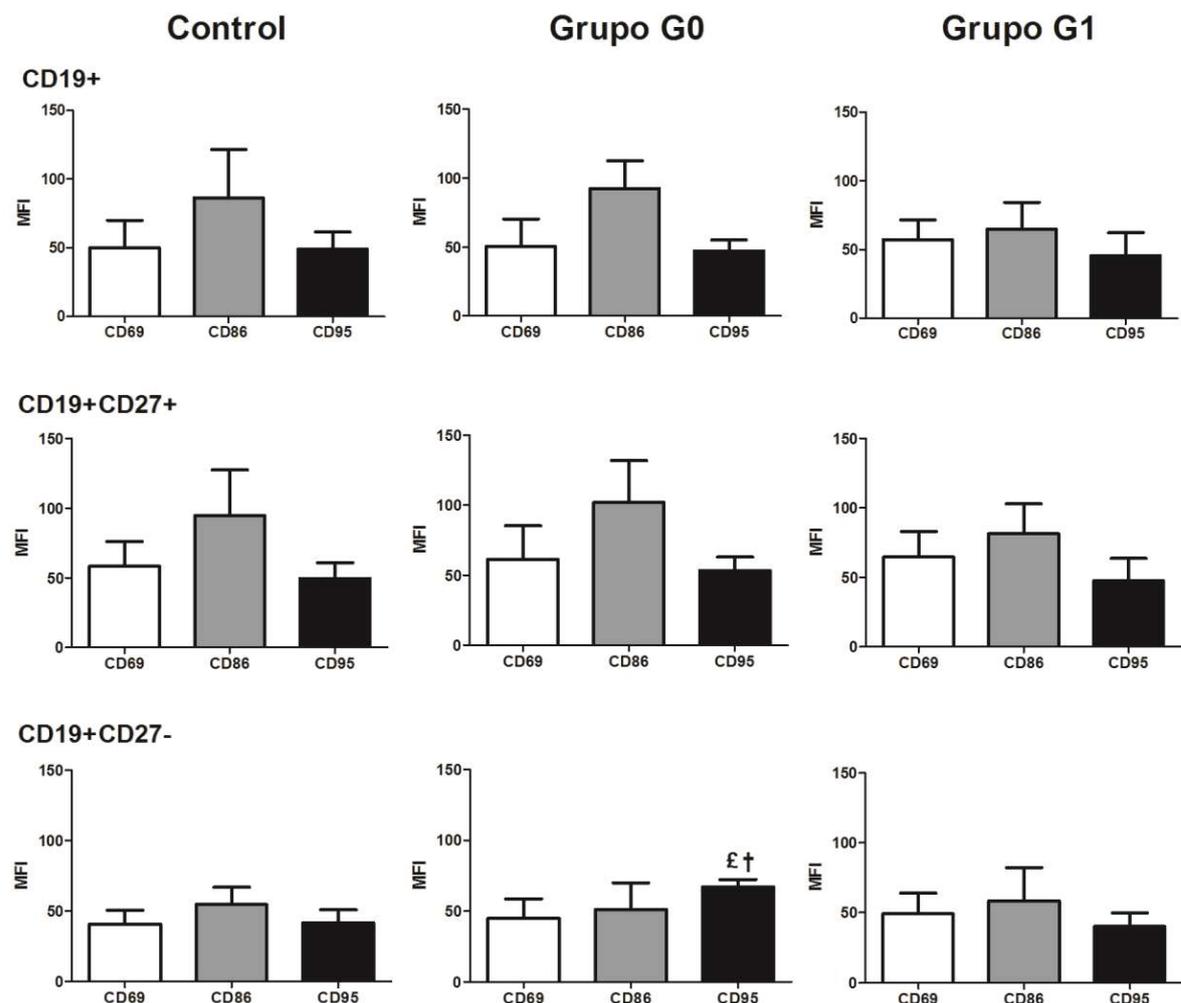


Figura 21. Expresión de marcadores de activación y co-estimulación en linfocitos B de sangre periférica. Expresión de los marcadores CD69, CD86 y CD95 en células CD19+, CD19+CD27+ y CD19+CD27- en individuos infectados con *T. cruzi* del grupo G0 y del grupo G1 y controles (5 individuos/grupo). Gráficos de barras con desvió estándar que muestran la intensidad de fluorescencia media (MFI) que expresan los diferentes marcadores indicados. El análisis estadístico se realizó por medio de la prueba de ANOVA seguido por Bonferroni o Kruskal-Wallis seguido por Dunn. £ $p < 0,05$ vs grupo control; † $p < 0,05$ vs grupo G1.

Expresión de CD86. La molécula CD86 es una proteína que se expresa en las células presentadoras de antígeno activadas y proporciona señales a través de su interacción con los ligandos complementarios en las células T CD4+, la molécula CD28 (activadora) y el CTLA-4 (inhibitoria) (Greenwald RJ y col., 2005). El análisis de la expresión ex-vivo de CD86 en subpoblaciones CD27+ y CD27- de linfocitos B CD19+ periféricos mostro porcentajes y niveles de intensidad similares en los individuos infectados y controles (Figura 19D y 21). En conjunto con los resultados observados con el marcador de activación temprana CD69 estos datos sugieren un estado de reposo inmunológico.

4.12. Funcionalidad de los linfocitos B de sangre periférica en los individuos con la enfermedad de Chagas crónica.

Para evaluar la capacidad funcional de los linfocitos B de sangre periférica, se estimularon PBMC con un lisado de epimatigotes o un coctel de citoquinas (IL-2, IL-6 e IL-10) durante 5 días, analizándose luego la expresión de CD27 e IgD en las células CD19+ por citometría de flujo, y los niveles de IgG en los sobrenadantes mediante la técnica de ELISA.

Caracterización fenotípica. El análisis de los cultivos sin estímulo por citometría de flujo mostró una menor proporción de células CD19+ totales respecto de las muestras ex-vivo ($p < 0,05$; Tabla 4), independientemente del estado de infección de los individuos.

Tabla 4. Porcentaje de células CD19+ circulantes en sangre periférica luego de 5 días de cultivo

Grupo	N° muestras	Ex-vivo	Cultivo in vitro	P
Control	5	19,00 ± 4,24	7,54 ± 2,59	0,0009
Infectado	5	12,67 ± 8,24	3,20 ± 2,93	0,0417

Los datos representan el porcentaje medio ± DS de células CD19+ ex-vivo y luego de 5 días de cultivo sin estímulo. Análisis estadístico: prueba de Mann-Whitney.

La proporción de células CD19+ en las muestras de los individuos infectados estimuladas in vitro con el coctel de citoquinas fue significativamente menor respecto de los controles, no hallándose diferencias significativas entre los distintos estímulos (Figura 22A). El análisis de la expresión

diferencial de CD27 e IgD mostró un cambio marcado en la composición de la población CD19+ en los cultivos respecto de la muestra ex-vivo, con predominancia de las poblaciones de memoria CD19+CD27+IgD- y CD19+CD27-IgD- y una marcada reducción de las poblaciones CD19+CD27+IgD+ y CD19+CD27-IgD+, en individuos infectados y controles independientemente del estímulo (Figura 22B).

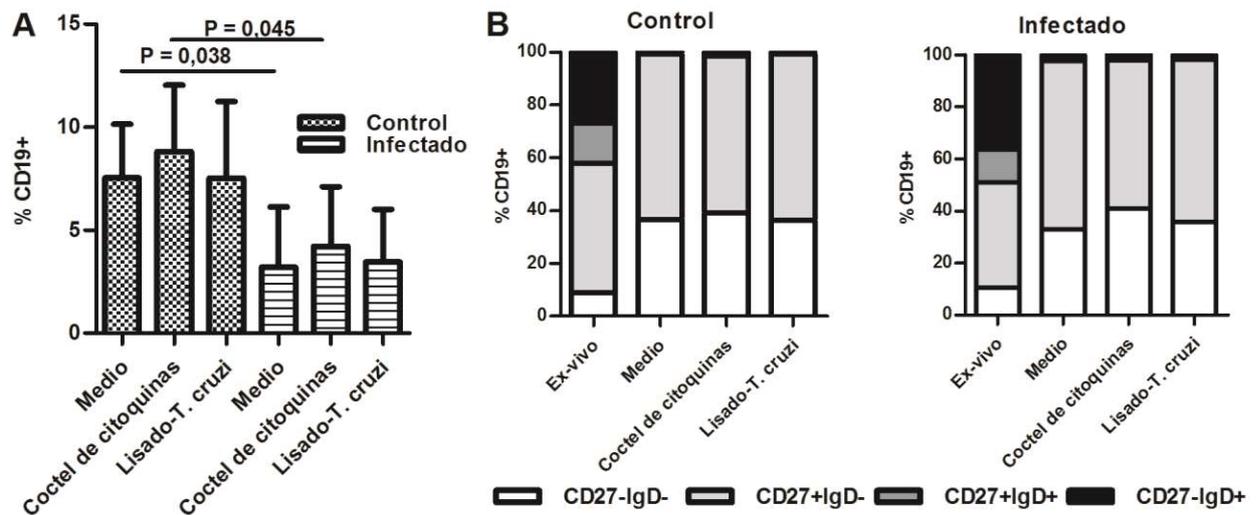


Figura 22. Caracterización fenotípica de los cultivos de PBMC in vitro. (A) Porcentaje de células B totales luego de estimulación policlonal y específica durante 5 días in vitro. Las barras representan la media +DS de células B totales. (B) Porcentaje medio de los subtipos celulares B mayores ex-vivo y luego del estímulo in vitro. El análisis estadístico se realizó para diferencias de medias entre los grupos estudiados por medio de prueba de Mann-Whitney o prueba T. Para la comparación de múltiples grupos se utilizó el prueba de ANOVA seguido por Bonferroni o Kruskal-Wallis seguido por Dunn. *p<0,05

Niveles de IgG total. El nivel de IgG total en los sobrenadantes de los cultivos de células de individuos infectados estimulados con el coctel de citoquinas fue significativamente mayor que en los cultivos estimulados con lisado de *T. cruzi* y respecto de los controles. La estimulación con el

lisado de *T. cruzi* indujo niveles similares de IgG total en los individuos infectados y controles ($p < 0,05$; Figura 23).

Niveles de IgG T. cruzi específica. El estímulo con el coctel de citoquinas y con el lisado de *T. cruzi* indujeron bajos niveles de IgG-específica tanto en los cultivos de células provenientes de individuos infectados como de los controles (Figura 23).

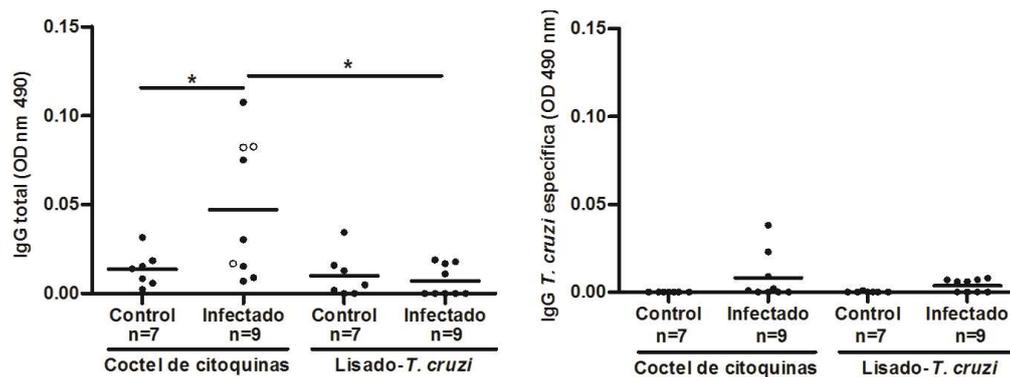


Figura 23. Funcionalidad de las células B in vitro. Nivel de IgG total y *T. cruzi*-específica secretada por linfocitos B de controles e individuos infectados. Cada punto representa el valor obtenido de un individuo analizado. El análisis estadístico se realizó para diferencias de medias entre los grupos estudiados por medio de prueba de Mann-Whitney o prueba T. Para la comparación de múltiples grupos se utilizó el prueba de ANOVA seguido por Bonferroni o Kruskal-Wallis seguido por Dunn.* $p < 0,05$.

En conjunto, los ensayos de estimulación in vitro demuestran que las células de memoria (CD19+CD27+IgD- y CD19+CD27-IgD-) conservan la capacidad de diferenciarse a células secretoras de IgG en respuesta al estímulo con citoquinas. Los bajos niveles de IgG específica para *T. cruzi* podrían estar relacionados a la reducción de células IgG+ circulantes y/o deficiente capacidad de respuesta específica.

4.13. Perfil de isotipo de IgG sérica en individuos con enfermedad de Chagas crónica.

Los anticuerpos específicos contra *T. cruzi* ejercen un rol crucial para el control del parásito durante la infección aguda, y podrían ser determinantes para la evolución hacia la fase crónica. Se han descrito 2 clases de anticuerpos específicos para *T. cruzi*: 1) Acs que neutralizan los tripomastigotes vivos (anticuerpos líticos), considerados como un factor importante para el control de la infección

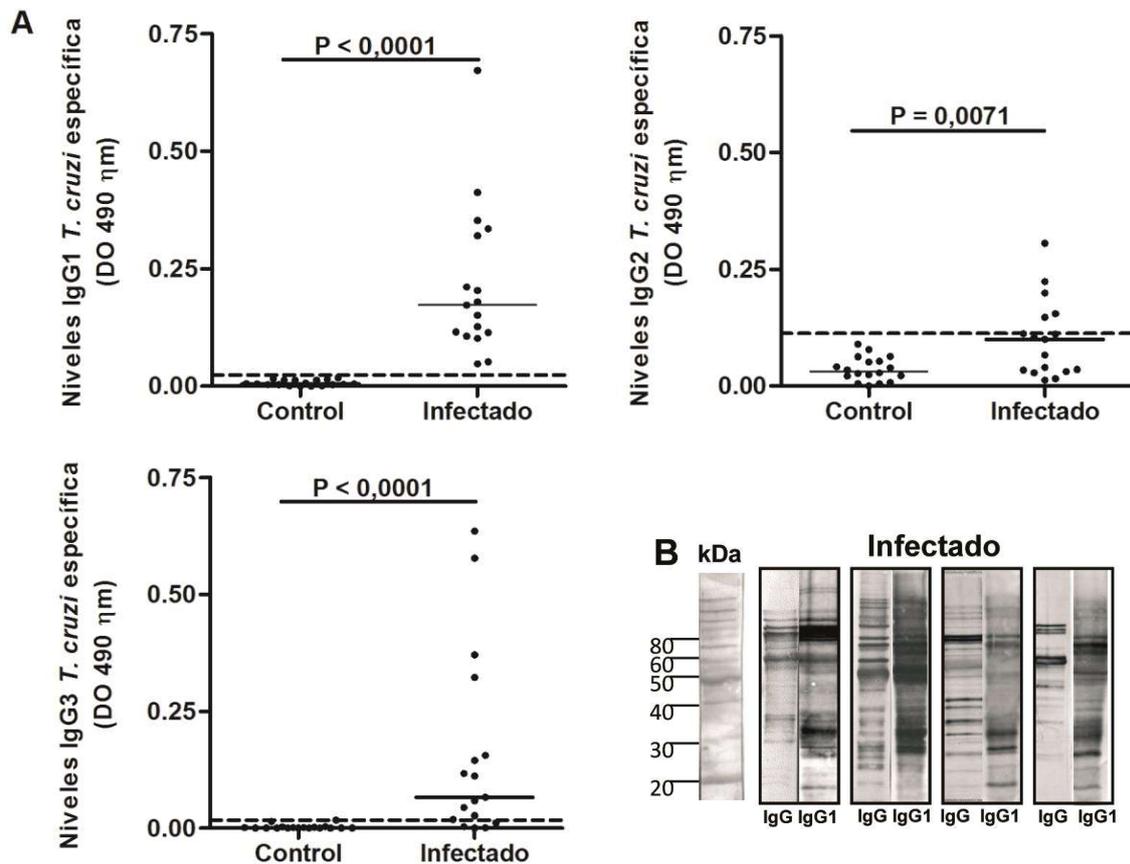


Figura 24. Reactividad sérica específica para *Trypanosoma cruzi* en individuos con la enfermedad de Chagas crónica. (A) Los símbolos representan los niveles de IgG1, IgG2 e IgG3 específicas para *T. cruzi* en cada individuo medida por ELISA (n = 17 individuos infectados y 18 controles). La línea horizontal representa la media para cada grupo. La línea de puntos representa la línea de corte para cada isotipo, estimada por el promedio de los controles no infectados + 3 DS. El análisis estadístico se realizó por medio de la prueba de Mann Whitney. (B) Figura representativa de la reactividad IgG e IgG1 sérica por Inmuno blotting hacia antígenos de *T. cruzi* en individuos infectados.

que se asocian al desarrollo de patología cardíaca, y 2) anticuerpos sin capacidad lítica que persisten luego del control de la parasitemia detectados por serología convencional (Krettli AU y col., 2009). En este trabajo se evaluaron las subclases de IgG específica en una muestra de nuestra población de estudio mediante ELISA, observándose reactividad sérica específica para *T. cruzi* de tipo IgG1 e IgG3 en 100% (17/17) y 64,7% (11/17) de los individuos infectados respectivamente, mientras que solamente el 29,4% (5/17) mostró reactividad anti-*T. cruzi* de tipo IgG2 (Figura 24; $p < 0,05$). La participación de IgG1 fue confirmada por inmunoblotting (Figura 24). No se detectó en ninguno de los sueros ensayados reactividad específica contra antígenos de *T. cruzi* de la subclase IgG4.

Los resultados de estos ensayos sugieren que el perfil de IgG específica podría estar relacionado con la expansión de la población de células B IgG⁺ de memoria CD27-IgD⁻ en los individuos infectados descrita en el análisis fenotípico.

DISCUSSION

5.DISCUSION

El compartimiento celular B está compuesto por subpoblaciones que incluyen a las células B inmaduras/transicionales, foliculares, del centro germinal, y memoria (con y sin cambio de isotipo), las cuales pueden ser distinguidas a través de la expresión de un conjunto particular de moléculas, tanto a nivel intracelular como en la superficie. La expresión diferencial de éstas moléculas acompaña la evolución de la respuesta inmune y reflejan la historia de exposición al antígeno y su capacidad funcional (Pape K y col., 2011; McHeyzer-Williams M y col., 2011; Shipkova M y col., 2012). La población de células B convencionales poseen la capacidad de adaptarse a nuevos antígenos y responder mediante diferenciación a plasmablastos y células plasmáticas con capacidad de producir nuevos anticuerpos específicos contra el mismo (respuesta adaptativa). En el presente trabajo de tesis se describe por primera vez que la infección crónica por *T. cruzi* en humanos provoca cambios en la distribución de las principales subpoblaciones de linfocitos B circulantes en sangre periférica. Particularmente, se observó una reducción selectiva de células B CD27+. El análisis de las subpoblaciones más importantes del compartimiento celular B reveló que la menor frecuencia de células B CD27+ resulta de la reducción combinada de células de memoria IgG+, IgM+ y con cambio de isotipo, células B precursoras y células plasmáticas terminalmente diferenciadas. La contracción de varios tipos de células B CD27+ en diferentes niveles del proceso de maduración sugiere un mecanismo común subyacente. El perfil fenotípico de las células B periféricas contrasta con los niveles sostenidos de anticuerpos *T. cruzi*-específicos usualmente detectados en el suero de los individuos infectados. Sin embargo, cuando las PBMC fueron estimuladas *in vitro* durante 5 días para promover la proliferación de células B de memoria circulante y su diferenciación a células plasmáticas terminalmente diferenciada, no se observó una respuesta IgG específica importante contra el parásito en los individuos infectados. Estos hallazgos demuestran que la infección crónica por *T. cruzi* provoca un estrechamiento del compartimiento celular B CD27+ en sangre periférica, y

que las células B de memoria circulante no son competentes para la generación de una respuesta IgG-específica importante.

La molécula CD19 es un co-receptor adyacente al BCR que regula positivamente la selección y maduración de los linfocitos B; su deficiencia induce detención del desarrollo de células B inmaduras (Avalos AM y col., 2014). La expresión de esta molécula ha sido utilizada por diferentes autores para estimar el tamaño de la población de linfocitos B en la infección humana por *T. cruzi*. En niños menores de 15 años de áreas endémicas de Bolivia se ha observado que el porcentaje de células CD19+ circulantes aumenta durante la fase crónica temprana de la infección, a pesar de que no se registraron alteraciones en su frecuencia durante la fase aguda (Sathler-Avelar R y col., 2003). También se ha comprobado aumento del porcentaje de células CD19+ en pacientes adultos de México con miocardiopatía chagásica crónica dilatada, similar a la observada en pacientes con miocardiopatía dilatada de etiología no chagásica (Piedras J y col., 1997). En cambio, otros autores han observado que los niveles de las células CD19+ circulantes se encuentran dentro de límites normales en pacientes adultos crónicamente infectados con *T. cruzi* residentes en áreas endémicas de Brasil, independientemente del tratamiento con drogas tripanocidas (Dutra WO y col., 1994 y 1996; Fares RCG y col., 2013). Por el contrario, en nuestra población de adultos con infección crónica por *T. cruzi* se observó una marcada reducción del porcentaje de células CD19+ circulantes. Estas discrepancias probablemente estén relacionadas con la diferente distribución geográfica y re-exposición a la infección en áreas endémicas, y la diversidad genética y ciclos de transmisión de los parásitos (Zingales B y col., 2012). La falta de relación detectada entre el porcentaje y número absoluto de células CD19+ en nuestra población de estudio sugiere podría ser consecuencia de cambios sufridos por otras poblaciones celulares comprendidas dentro de las PBMC (por ej., linfocitos T, NK, monocitos, etc). En la infección por crónica por *T. cruzi* se ha descrito disminución de la proporción de linfocitos T (CD3+) totales, a pesar de que las proporciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ totales no varían y la proporción de linfocitos NKT CD3+CD16+/-CD56+/- aumenta

en sangre periférica. Por otro lado, también se ha descrito aumento de la proporción de células NK (CD3-CD16+) totales en individuos con infección crónica por *T. cruzi*, con aumento de células NK CD56+ citotóxicas maduras y disminución de las CD56- precursoras (Vitelli-Avelar DM y col 2005). En nuestro estudio, el análisis del valor absoluto de células CD19+ demostró niveles similares en los individuos infectados y controles, lo cual nos permitió determinar la conformación del compartimiento celular B periférico con mayor precisión.

La expresión del marcador de superficie CD27 por los linfocitos B indica su estado de activación y capacidad de proliferación, presentación antigénica y diferenciación a células plasmáticas (Agematsu K y col., 2000). La población de células B que expresa CD27 es compleja y comprende subpoblaciones celulares fenotípica y funcionalmente diferentes. La expresión diferencial de IgD en las células CD19+CD27+ permite distinguir 2 grandes subpoblaciones de células B de memoria: las células CD27+IgD- que secretan principalmente anticuerpos IgG e IgA dirigidos contra péptidos en respuesta a la interacción con linfocitos T CD4+, y las células CD27+IgD+ que secretan principalmente anticuerpos IgM dirigidos contra carbohidratos de forma dependiente o independiente de células T CD4+ (Maurer D y col., 1992; Weller S y col., 2012). Debido a la baja frecuencia de células plasmáticas en sangre periférica y que la proliferación de células B se circunscribe a los centros germinales de los tejidos linfoides secundarios, algunos autores consideran que la mayoría de las células B CD27+ periféricas del ser humano son “células B de memoria” (Kaminski DA y col., 2012). Sin embargo, el compartimiento celular B de memoria es mucho más complejo de lo descrito originalmente, reconociéndose en la actualidad numerosos subtipos celulares (Taylor JJ y col., 2012; Wu YC y col., 2011). Las células CD19+CD27+ tienden a mostrar secuencias de ADN características de hipermutación somática en las regiones variables de sus inmunoglobulinas (IgV), tanto en las células IgD- (memoria con cambio de isotipo, con mayor frecuencia de SHM) como en las células IgD+ (sin cambio de isotipo, y menor frecuencia de SHM) (Pascual V y col., 1994; Dunn-Walters DK y col., 1995; Klein U y col., 1998). En el presente trabajo

se demuestra que la población de células B de memoria CD27+ (IgD+ e IgD-) sufre una importante contracción a consecuencia de la infección crónica por *T. cruzi*. Una contracción similar de linfocitos B CD27+ fue descrita en otras enfermedades inflamatorias crónicas, como por ejemplo la inmunodeficiencia común variable (CVID) (Piqueras B y col., 2003), el síndrome de Sjögren (Bohnhorst JØ y col., 2001;), artritis reumatoidea (RA) (Souto-Carneiro B y col., 2009;), sarcoidosis severa crónica (Lee NS y col., 2011), y en infecciones crónicas con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Tendeiro R y col., 2012) y tuberculosis multi-resistente a drogas (MDR-TB) (Abreu MT y col., 2013), indicando que se trata de un fenómeno relativamente común en enfermedades inflamatorias de diferente etiología.

En base al estudio molecular de su historia replicativa, secuenciación, hipermutación somática y perfil de expresión de inmunoglobulinas, se ha propuesto que los linfocitos B de memoria pueden generarse a través de diferentes vías de diferenciación (Fecteau JF y col., 2006; Wei C y col., 2007; Berkowska MA y col., 2011; Wu YC y col., 2011). Se ha descrito una población de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo (IgD-) que no expresan CD27 (doble negativa) que representa aproximadamente 5% de la población total de células CD19+ y comparte el fenotipo de superficie e SHM a nivel de la IgV con las células B CD27+IgD- (Wirhth S y Lanzavecchia A, 2005; Fecteau JF y col., 2006; Wei C y col., 2007; Wu YC y col., 2011). Sin embargo, el número de SHM en las células B CD27-IgD- es variable y generalmente menor que en las células B CD27+IgD- (Fecteau JF y col., 2006; Wei C y col., 2007). El análisis de secuenciación e historia clonal sugieren que las células B CD27-IgD- pueden convertirse en células B de CD27+IgD- y *viceversa* (Wu YC y col., 2011), de manera que ambos compartimientos de células IgD- pueden pasar por diferentes estadios de diferenciación y revertir los cambios de expresión de la molécula CD27. La expresión diferencial de IgA, IgG e IgM en conjunto con CD27 e IgD permite definir diferentes subpoblaciones de células B de memoria: memoria IgA+/IgG+ clásica (IgA+/IgG+CD27+IgD-), memoria IgM+ (IgM+CD27+IgD-), memoria IgA+/IgG+/IgM+CD27-IgD- y memoria total con cambio de isotipo

(IgM-CD27+IgD-). El perfil molecular de las células B IgG+CD27-IgD- e IgM+CD27+IgD- se asemeja a las células generadas durante la respuesta primaria, mientras que las células B IgG+CD27+ e IgA+CD27+ se asemejan a las células generadas durante la respuesta secundaria, a nivel del centro germinal (Fecteau JF y col., 2006; Wei C y col., 2007; Berkowska MA y col., 2011; Wu YC y col., 2011). Diferentes autores han descrito que la respuesta inmune humoral específica contra *T. cruzi* involucra la participación de IgM (etapa aguda) e IgG (etapa crónica) (Vattuone NH y col., 1973; Scott MT y col., 1984). En el presente trabajo se evaluó el perfil de fenotípico de la población celular B de memoria IgG+ e IgM+ en la infección crónica por *T. cruzi*, detectándose una marcada reducción de células B de memoria IgG+ clásica, IgM+ y memoria total con cambio de isotipo, que se correlacionó positivamente con los niveles de células B CD27+IgD-, indicando la contribución de estas 3 subpoblaciones celulares a la contracción del compartimiento celular B de memoria CD27+ principal. Por el contrario, la infección provocó expansión de células B IgG+ con fenotipo CD27-IgD-, que no afectó el volumen total del compartimiento celular de memoria CD27-. Estas alteraciones fenotípicas son similares en forma individual a las descritas para otras enfermedades. Por ejemplo, en la enfermedad granulomatosa crónica se describió una reducción de células B de memoria clásica similar a la observada en la infección por *T. cruzi*; sin embargo, a diferencia de lo observado en los individuos infectados con *T. cruzi*, la reducción de células de memoria IgG+ en la enfermedad granulomatosa involucro también a la población de células IgG+CD27-IgD- (Moir S y col., 2012). Por otro lado, se ha descrito reducción de células B de memoria totales con cambio de isotipo (IgM-CD27+IgD-) en la inmunodeficiencia común variable y sarcoidosis crónica (Patuzzo G y col., 2013; Heaps A y col., 2012), mientras que las células IgM+CD27+IgD- e IgG+CD27-IgD- aumentan en enfermedades autoinmunes como en el síndrome hiper-IgM y lupus eritematoso sistémico (SLE) (Weller S y col., 2004; Wei C y col., 2007).

Además de las células B convencionales, se pueden distinguir otras subpoblaciones de células B que forman parte del sistema inmune innato IgM+CD27+IgD+. Las células IgM+CD27+IgD+

constituyen una población compleja cuya función como “célula B efectora natural” y/o de memoria son aún motivo de debate (Berkowska MA y col., 2011; van Zelm MC y col., 2012). Estas células poseen características de células B de memoria ya que responden rápidamente a señales de activación in vitro, expresan marcadores de activación, muestran signos de hipermutación somática en la región variable de su Ig e historial replicativo que indican su maduración en el CG. Sin embargo, se ha descrito la presencia de células B IgM+CD27+IgD+ circulantes en individuos deficientes en la expresión de CD40 ó CD40L que no desarrollan centros germinales, indicando que parte de esta población derivan independiente de células T CD4+ complementarias (Seifert M y Kuppers R, 2009). La población B IgM+CD27+IgD+ comprende células de zona marginal especializadas en respuesta a patógenos circulantes en sangre periférica, y células B-1 que poseen la capacidad de secretar de forma constitutiva y espontánea “anticuerpos naturales” dirigidos contra epítopes comunes (Rothstein TL y col., 2013). La infección por *T. cruzi* no afecta particularmente la frecuencia de células B que comparten el fenotipo IgM+CD27+IgD+. Por otro lado, en este estudio no se incluyeron marcadores que puedan identificar las subpoblaciones comprendidas dentro de este fenotipo, como CD24 y CD38 para células B de zona marginal esplénica y originados en el CG, CD43 para linfocitos B-1, y CD25 e IL-10 para linfocitos B regulatorios. Por lo tanto, no se puede descartar que la infección modifique alguna de las subpoblaciones comprendidas dentro del fenotipo CD19+IgM+CD27+IgD+.

Las células plasmáticas son las principales productoras de anticuerpos y su diferenciación puede ocurrir a nivel de los centros germinales o de forma extra-folicular (Fairfax KA y col., 2008). El fenotipo varía de acuerdo a la célula de origen, en términos de sobrevivencia, localización, calidad y cantidad de los anticuerpos secretados (Taylor JJ y col., 2012). La respuesta generada en el centro germinal permite la integración de señales externas, que retrasan su diferenciación, eventualmente generando células plasmáticas capaces de secretar anticuerpos de alta afinidad de una determinada clase que persisten durante toda la vida. En cambio, la diferenciación extra-folicular genera una

célula plasmática de corta vida que secreta anticuerpos con baja afinidad (Fairfax KA y col., 2008; Oracki SA y col., 2010). En condiciones de homeostasis, las células plasmáticas representan aproximadamente el 2% del total de células B circulantes. Diferentes autores han descrito aumento de células plasmáticas circulantes en enfermedades inflamatorias crónicas en humanos tales como sarcoidosis e hipersensibilidad del tipo I, y enfermedades autoinmunes como SLE y Sjögren (Lee NS y col., 2011; Hiepe F y col., 2011; Luger EO y col., 2009). En cambio en tuberculosis multi-resistente a drogas (MDR-TB) se ha observado reducción de células plasmáticas circulantes sugiriendo su acumulación a nivel de los tejidos afectados durante la infección (Abreu MT y col., 2013). Un fenómeno similar de acumulación de células plasmáticas en tejidos periféricos ha sido descrito en artritis reumatoidea (Souto-Carneiro MM y col., 2009). En la infección experimental aguda por *T. cruzi* se ha descrito expansión de células plasmáticas foliculares y extra-foliculares productoras de anticuerpos específicos para el parásito, principalmente a nivel del bazo y ganglios linfáticos, con marcada reducción de las células CD138+B220+ residentes en médula ósea (Bermejo DA y col., 2011). En cambio, como se determinó en este estudio, la infección crónica por *T. cruzi* en humanos resulta en una marcada reducción de células plasmáticas CD27+CD138+ circulantes en sangre periférica, que sin embargo no afecta la producción de anticuerpos específicos contra el parásito. Diferentes autores han descrito que el número de células plasmáticas es muy bajo o están ausentes en los tejidos afectados por la infección (Reis DD y col., 1993b; Cobo EC y col., 2012), lo cual sugiere que es poco probable que su reducción en sangre periférica se relacione con acumulación en los órganos afectados, como se observó en tuberculosis y artritis reumatoidea. En base a los estudios experimentales descritos anteriormente y los altos niveles de anticuerpos específicos séricos para el parásito en la infección humana por *T. cruzi*, es posible que las células plasmáticas específicas se localicen en los tejidos linfoides primarios y secundarios, con escasa circulación en la periferia.

El compartimiento de linfocitos B inmaduros/transicionales es muy heterogéneo e incluye células que abandonan la médula ósea en diferentes estadios de maduración, representando aproximadamente 2-4% de los linfocitos B en sangre periférica (Suryani S y col., 2010). Diferentes estudios han definido a esta población en base a la co-expresión del marcador de superficie CD10, en concomitancia con CD24, CD38, IgM, IgD y CD21 y ausencia de expresión de CD27 de superficie (Sims GP y col., 2005; Anolik JH y col., 2009; Perez-Andres M y col., 2010). En el modelo experimental murino de infección por *T. cruzi* se ha descrito depleción de linfocitos B inmaduros a nivel de la médula ósea y sangre periférica (Acosta-Rodriguez EV y col., 2007). A diferencia de lo observado en la infección experimental, en este trabajo no se detectaron cambios significativos en la proporción y número absoluto de células B CD10⁺ circulantes en sangre periférica de individuos infectados crónicamente con el parásito. La expresión diferencial del marcador de superficie CD27 en los linfocitos B CD10⁺ permite la identificación de células B inmaduras/transicionales CD10⁺CD27⁻ y células B precursoras del tipo CG CD10⁺CD27⁺ (Vaskova M y col, 2008; Moir S y col., 2008). La infección por *T. cruzi* no afectó el tamaño de la población de linfocitos B inmaduros/transicionales, pero provocó contracción de la pequeña población de células B precursoras circulantes. En la infección por HIV, Tendeiro y col. también describen disminución de células B de memoria total CD27⁺, CD27⁺IgD⁻ y CD27⁺IgD⁺ aunque con aumento de células CD10⁺CD27⁻ (Tendeiro R y col., 2012). Por otro lado, Abreu y col. utilizando los marcadores CD38 e IgD describen aumento de células B transicionales en la infección MDR-TB en asociación con disminución de células B de memoria total CD27⁺ y CD27⁺IgD⁺, aunque sin alteraciones de la memoria CD27⁺IgD⁻ (Abreu MT y col., 2013;). Utilizando los marcadores CD24 y CD38, Cuss y col. también han descrito aumento en la frecuencia de células transicionales (CD10⁺CD24^{hi}CD38^{hi}) y disminución de los niveles de células CD24⁺CD38⁻ (memoria) en pacientes con inmunodeficiencias tales como síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP) y COVID, y transitoriamente luego del trasplante de células madres

hematopoyéticas aunque tanto las células B inmaduras/transicionales como de memoria se recuperan parcialmente (Cuss AK y col., 2006). La reducción de células B de memoria sin cambios en los niveles de células B inmaduras/transicionales en la infección crónica por *T. cruzi* sugieren la participación de mecanismos diferentes a los involucrados en las enfermedades autoinmunes e infecciones crónicas descritas anteriormente.

Una adecuada repuesta humoral específica requiere la participación de los linfocitos T CD4+ complementarios que determina su maduración y desarrollo de células B de memoria y diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Lanzavecchia A y col., 1985). Es posible que los cambios del perfil fenotípico de los linfocitos T CD4+ periféricos observados previamente por diferentes autores, incluido nuestro grupo de trabajo, en los individuos con infección crónica por *T. cruzi* puedan contribuir a la alteración fenotípica detectada en el compartimiento celular B. Por lo tanto, se consideró importante evaluar en nuestra población de estudio la expresión del marcador de memoria CD45RO en los linfocitos T CD4+. Este análisis reveló que la población T CD4+ de memoria total se incrementa en individuos con infección crónica por *T. cruzi*, contrastando con lo descrito por Araujo-Fiuza y col., quienes observaron proporciones similares de estas células entre individuos adultos infectados independientemente del grado de compromiso cardíaco y controles sanos de Brasil (Araujo-Fiuza J y col., 2009). La determinación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ de memoria confirmó los resultados obtenidos previamente con el marcador CD45RA en cuanto al aumento de la frecuencia de células T CD4+ de memoria totalmente diferenciada (CD45RA-/CD45RO+CD27-) y disminución de células T CD4+ de memoria temprana (CD45RA-/CD45RO+CD27+) (Albareda MC y col., 2009). La molécula CD27 se expresa constitutivamente en los timocitos CD3^{hi} de la médula tímica. Las células emigrantes tímicas poseen una alta capacidad de regular positivamente la expresión de CD27 a través del complejo TCR/CD3, por lo que su expresión es considerada un marcador de activación de los linfocitos T CD4+. Los linfocitos T CD4+ de tipo virgen también expresan CD27 de

superficie, pero a diferencia de las células T de memoria expresan además CD45RA de superficie (Hintzen RQ y col., 1994). Considerando que los linfocitos T CD4⁺ de tipo virgen CD45RA⁺CD27⁺ también disminuyen durante la infección crónica por *T. cruzi*, es posible que ocurra un fenómeno de desregulación T CD4⁺ que afecte particularmente la vía de señalización de CD27. Para comprobar esta hipótesis, se determinó el nivel de linfocitos T CD4⁺CD27⁺ circulantes, observándose reducción del porcentaje relativo de células con este fenotipo en los individuos infectados que se correlacionó positivamente con el porcentaje de células CD19⁺CD27⁺, sugiriendo que la disminución de las células T CD4⁺ activadas afecta negativamente la proliferación y maduración de los linfocitos B dependiente de los linfocitos T CD4⁺ a nivel del CG.

La mayor expresión del CD27 directamente implicada en la activación de células T vía el complejo TCR/CD3 genera una forma soluble de la molécula (sCD27) que puede ser encontrada luego en la sangre y fluidos corporales, particularmente en las infecciones virales crónicas, enfermedades autoinmunes y linfomas de células B (Loenen WA y col., 1992; Hintzen RQ y col., 1991; van Oers MH y col., 1993; Huang J y col., 2013; Dekkers PE y col., 2000), constituyendo un parámetro clínico con valor pronóstico independiente (Tadmor T y Polliak A, 2012). En este trabajo se estimaron los niveles séricos de sCD27 en los individuos crónicamente infectados con *T. cruzi*, hallándose niveles séricos más altos en los individuos con cardiomiopatía chagásica crónica respecto a los otros grupos de individuos infectados y controles. Estos resultados sugieren que el clivaje de la molécula CD27 de membrana por la acción de metaloproteasas no constituye un mecanismo importante que afecte las células B y T activadas de sangre periférica en etapas tempranas de la infección crónica (Kato K y col., 2007; Khokha R y col., 2013). El hallazgo de altos niveles de sCD27 en asociación con cardiomiopatía chagásica resulta de gran interés por su potencial utilidad para el monitoreo de la progresión de la enfermedad en áreas endémicas para Chagas, ya que la técnica de ELISA es mucho más simple y económica, y requiere menor equipamiento que la citometría de flujo. Finalmente, el análisis del perfil fenotípico de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y B circulante en sangre

periférica no permite establecer si la disminución de las células CD27⁺ observada en los individuos con infección crónica por *T. cruzi* sea en parte el resultado de una regulación negativa del CD27.

La activación policlonal de linfocitos B y la producción de anticuerpos dirigidos contra un amplio rango de estructuras conservadas es considerada crucial para evitar la rápida multiplicación del parásito durante la etapa temprana de la infección. Se ha propuesto que la activación policlonal de linfocitos constituye el principal mecanismo de vía de escape a la respuesta humoral y de desregulación inmunológica durante la etapa aguda, promoviendo la generación de anticuerpos irrelevantes en desmedro de anticuerpos específicos, fenómeno fundamental para el establecimiento de la infección crónica (Minoprio P y col., 1989). La activación policlonal B inducida por el parásito resulta en hipergamaglobulinemia con generación de anticuerpos específicos contra antígenos del parásito y propios del huésped (Minoprio P y col., 1988). Diferentes autores coinciden en que los anticuerpos generados durante la etapa aguda de la infección con *T. cruzi*, tanto en humanos como en ratones, ejercen un rol protector, dependiendo de su capacidad lítica para lograr la eliminación de los trypomastigotes de sangre periférica (Kierszenbaum F y Howard JG, 1976; Almeida IC y col., 1991; Krettli AU y Brener Z, 1976).

El *Trypanosoma cruzi* es una especie heterogénea, y las variaciones genéticas entre parásitos influyen las características de virulencia y patogenicidad de los aislamientos parasitarios. Las cepas de *T. cruzi* han sido clasificadas en unidades de tipificación discretas (DTUs I-VI) asociadas con la distribución geográfica y ciclos de transmisión (Zingales B y col., 2012). Se ha demostrado que la diversidad genética del parásito se relaciona con el patrón de respuesta inmune humoral y la evolución de infección en seres humanos (dos Santos DM y col., 2009; Zingales B y col., 2012). Diferentes autores de Argentina, Brasil y Colombia han mostrado que los anticuerpos capaces de neutralizar los trypomastigotes son subclases IgG1 e IgG3, potentes inductores de complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Cerban FM y col., 1993; Morgan J y col., 1996; Cordeiro FD y col., 2001; Flechas ID y col., 2009; Nunes DF y col., 2013). Las subclases IgG1 e

IgG2 específicas contra *T. cruzi* predominan en los individuos con cardiomiopatía chagásica crónica de México (Hernández-Becerril N y col., 2001). En concordancia con lo descrito por Cerban y col., en nuestra población predomina la reactividad sérica IgG1 e IgG3 específica para antígenos de *T. cruzi*, con menor reactividad IgG2. Sin embargo, la técnica de ELISA utilizada en nuestro laboratorio fue poco sensible para detectar reactividad IgG4 específica contra *T. cruzi*, posiblemente relacionado con su menor concentración en sangre periférica respecto a los otros isotipos de IgG. Por otro lado, no se observaron las diferencias en los niveles de anticuerpos entre individuos asintomáticos y en etapas tempranas de compromiso del sistema de conducción cardíaco descrito por estos autores. Estos resultados aparentemente discordantes pueden deberse a los diferentes preparaciones antigénicas utilizadas en los ensayos y los diferentes DTUs del parásito circulantes en cada área (dos Santos DM y col., 2009).

Varios estudios han mostrado que las células B de memoria IgG+ clásica e IgG+CD27-IgD- expresan preferencialmente distintas subclases de IgG, sugiriendo un rol diferente para cada tipo celular durante la respuesta inmune secundaria (Wu y col., 2011; Fecteau y col., 2006; Wei y col., 2007; Berkowska y col., 2011). Las células de memoria clásica expresan principalmente IgG1 e IgG2, con menor expresión de IgG3 e IgG4. En cambio, las células IgG+CD27-IgD- expresan principalmente IgG1 e IgG3, con poca IgG2 y ausencia de IgG4 (Fecteau y col., 2006; Wirths, S., and A. Lanzavecchia. 2005; Wei C y col., 2007; Berkowska y col., 2011; Wu YC y col., 2011). Es interesante destacar que nosotros observamos expansión de las células B de memoria IgG+CD27-IgD- en los individuos infectados con *T. cruzi*, en concordancia con la mayor reactividad sérica IgG1 e IgG3 contra el parásito, sugiriendo el potencial rol de las células B con este fenotipo en la producción de los anticuerpos líticos. Estos resultados sugieren que las células B de memoria IgG+CD27-IgD- estarían involucradas en la producción de anticuerpos líticos IgG1 y IgG3 específicos para *T. cruzi*. Para resolver este punto sería necesario determinar si las células B

IgG+CD27-IgD- son productoras de las inmunoglobulinas IgG1 e IgG3 anti-*T. cruzi*, y si éstas reconocen antígenos parasitarios y/o moléculas propias del huésped.

La expansión de las poblaciones con fenotipo CD27+IgD- y CD27-IgD- luego de la estimulación policlonal in vitro indica que las células B de memoria periféricas conservan la capacidad de respuesta y diferenciación a células plasmáticas con producción de anticuerpos policlonales. La escasa producción de anticuerpos IgG *T. cruzi*-específicos por las células B circulantes in vitro contrasta con los altos niveles de IgG sérica detectados en pacientes con infección crónica. Aunque es posible que la infección afecte particularmente la población de células B de memoria clásica circulantes específicas para el parásito, a modo de eliminación clonal (Zuñiga E y col., 2002), las células B específicas podrían perder la capacidad de secretar anticuerpos específicos una vez liberadas a la circulación. También es posible que las condiciones experimentales utilizadas en los ensayos in vitro no sean las adecuadas para estimular la secreción de anticuerpos específicos (Zabel F y col., 2013). Finalmente, las células B de memoria específica podrían permanecer confinadas en los tejidos linfoides, con escasa o limitada circulación en la periferia.

La respuesta inmune adaptativa requiere la cooperación entre linfocitos B y T a través de pares de receptores/ligandos involucrados en la señalización bidireccional entre ambos tipos celulares mediante los cuales pueden monitorear y responder a estímulos del medio ambiente. (Clark EA y Ledbetter JA, 1994). Estos receptores y ligandos, conocidos como moléculas de co-señalización, son vitales para la diferenciación, reconocimiento y función celular. Se ha propuesto los linfocitos activan sólo parcialmente en respuesta a la interacción con el complejo antígeno-receptor (Señal 1), y para su óptima activación requieren de una segunda señal a través de las moléculas de co-señalización (Señal 2) (Lafferty y Cunningham, 1975). La expresión de las moléculas de co-señalización se encuentra altamente regulada y es específica para cada localización y estadio celular de las diferentes células del sistema inmune, orquestando el tipo de respuesta celular. El análisis funcional de las moléculas de co-señalización indica que algunas ejercen acción co-estimuladora

mientras que otras son co-inhibitorias (Zhu Y y col., 2011). Las moléculas de co-señalización, tanto co-estimuladoras como co-inhibitorias, actúan como moduladoras de la respuesta inmune celular, regulando la magnitud y el direccionamiento de la misma. Se ha descrito que la eliminación de las moléculas co-inhibitorias frecuentemente conduce a enfermedades autoinmunes asociadas con hiperactivación de células T. El estudio de las moléculas de co-señalización celular inmune ha permitido separarlas en varias familias de genes como por ejemplo, la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y de las inmunoglobulinas (Ig), entre otras. La molécula CD86 es una inmunoglobulina transmembrana que pertenece a la familia de ligandos B7 expresada constitutivamente en células dendríticas, macrófagos y linfocitos B en estado de reposo, y aumenta su expresión luego de la activación por señales inflamatorias o antigénicas. Esta molécula posee un rol importante tanto en la activación como regulación de la tolerancia de linfocitos T. En asociación con la señal primaria antígeno-MHC-II/TCR, la interacción de la molécula CD86 con el receptor CD28 provee señales co-estimuladoras que promueven la activación y supervivencia de los linfocitos T. En cambio, la interacción de CD86 con CTLA-4 provee señales inhibitorias que limitan, terminan y/o atenúan la respuesta celular T ante un antígeno foráneo (Greenwald RJ y col., 2005). Sin embargo, se ha demostrado que la ausencia de CD86 afecta la formación de CG, la generación de células de memoria, la SHM y el CSR, sugiriendo que la señalización a través del CD86 es bidireccional en los linfocitos B y T, e influye en la magnitud y calidad de la respuesta celular B (Rau FC y col., 2009). En la infección experimental por *T. cruzi*, Miyahira y col. han descrito exacerbación de la parasitemia y 100% de mortalidad de ratones transgénicos que no expresan CD28, y la vacunación con DNA parasitario no induce respuesta T CD8⁺ protectora como la observada en ratones normales. Además, la estimulación in vitro de esplenocitos y células T CD8⁺ provenientes de ratones CD28⁻ infectados con antígeno de *T. cruzi* resulta en una deficiente producción de IFN- γ . Por otro lado, el bloqueo de las moléculas CD80 y CD86 in vivo mediante la administración de anticuerpos específicos a ratones normales infectados por *T. cruzi* también generó

exacerbación de parasitemia y 100% de mortalidad, sugiriendo que la señalización a través de la vía CD28-CD80/CD86 es crítica para conferir resistencia a la infección por *T. cruzi* (Miyahira Y y col., 2003). En la infección crónica humana se ha demostrado que la estimulación in vitro de PBMC con antígeno soluble de *T. cruzi* induce la expresión de CD80 y CD86 en células CD19 (Fares RCG y col., 2013). En nuestro trabajo no se detectaron cambios en los niveles de expresión de CD86 en los linfocitos B periféricos ex-vivo, indicando su estado de reposo inmunológico, a pesar de la persistencia de ADN parasitario en sangre periférica de pacientes demostrada por diferentes autores (Burgos JM y col., 2010). Un resultado similar fue observado con la molécula CD69 (lectina de tipo-C), utilizado como marcador de activación de leucocitos e involucrado en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias crónicas. Se ha descrito que ratones deficientes en CD69 poseen una elevada susceptibilidad a diferentes enfermedades inflamatorias, particularmente aquellas mediadas por linfocitos Th17 (González-Amaro R y col., 2013). En base a nuestros resultados y lo observado en el modelo murino, es posible que las células B específicas para el parásito están pobremente representadas en sangre periférica de individuos infectados por *T. cruzi*, lo que explicaría en parte que no se observen alteraciones en los niveles de marcadores de activación temprana de las células B periféricas.

Los receptores/ligandos perteneciente a la superfamilia TNF consisten en aproximadamente 50 proteínas solubles y de membrana altamente conservadas en todos los mamíferos con capacidad moduladora de la función celular. La mayoría de estas moléculas pueden ejercer una gran variedad de funciones como promover o inhibir la proliferación y diferenciación celular, inducir la sobrevida o apoptosis, y producir citoquinas y/o quemoquinas. (Croft M y col., 2012). En particular, los receptores CD95 (Fas), CD40 y CD27, expresados por los linfocitos B, y sus ligandos CD95L (FasL), CD40L o CD154 y CD70 expresados por los linfocitos T activados poseen roles esenciales en el desarrollo de una correcta respuesta inmune.

En el desarrollo de la respuesta B antígeno-específica, la molécula CD95 posee una participación crucial para la disminución de la intensidad de la respuesta inmune durante la fase de contracción, ya que induce apoptosis de las células B activadas a través de la interacción con su ligando CD95L expresado por las células T a nivel del CG. La ausencia de CD95 bloquea la selección de células B con alta afinidad en el CG, sugiriendo que esta molécula es importante para la selección clonal (Takahashi YH y col., 2001). En modelos experimentales de infección aguda por *T. cruzi* se ha descrito que las células B activadas expresan mayores niveles de Fas y FasL, haciéndolas más susceptibles al fratricidio mediado por apoptosis (muerte de células B por células B). El bloqueo de FasL mediante la administración de un anticuerpo específico in vivo aumenta la respuesta humoral específica contra el parásito, sin afectar la tolerancia del huésped (Acosta-Rodriguez EV y col., 2007). En la infección humana no se observaron cambios en las proporciones de linfocitos B CD95+ en individuos infectados, aunque se detectó mayor intensidad de fluorescencia en la población celular CD19+CD27- de individuos asintomáticos respecto de individuos con alteraciones ECG sin cardiopatía y controles. Un patrón de expresión similar ha sido descrito en pacientes con SLE, habiéndose sugerido que la expresión de CD95 en células CD19+CD27- denota un fenotipo activado de células de memoria, proponiéndose su utilización como biomarcador de actividad de la enfermedad (Jacobi AM y col., 2008). También se ha descrito doble expresión de Fas/FasL y apoptosis en asociación con altos niveles de producción de TNF- α y baja respuesta proliferativa en PBMC de individuos con enfermedad de Chagas crónica con compromiso cardíaco (Rodrigues V y col., 2008). Teniendo en cuenta que apoptosis es un mecanismo inmuno-regulatorio que se acciona para controlar la expansión excesiva de los linfocitos B activados, es probable que la mayor expresión de CD95 constituya un mecanismo inducido por el parásito para interferir con la respuesta protectora de los anticuerpos líticos producidos por las células B de memoria CD27-.

Otros autores han descrito niveles similares de Fas/FasL y caspasa-3 en linfocitos T CD4+ en individuos infectados crónicamente con *T. cruzi*, aunque con mayor expresión de anexina-V

independientemente del grado de compromiso cardíaco (Keesen TSL y col., 2012). En concordancia con lo descrito por Keesen y col., en nuestro grupo de estudio tampoco se detectaron cambios en los niveles de expresión de CD95 en los linfocitos T CD4+, independiente de la expresión o no de CD27. Sin embargo, en un estudio previo de nuestro laboratorio focalizado en diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4+ se observó mayor expresión de caspasa-3 en linfocitos T CD4+ efectores y vírgenes en asociación con cardiopatía chagásica crónica, no encontrándose alteraciones en estadios más tempranos (Albareda MC y col., 2009).

La molécula de CD40 se expresa constitutivamente en las células B, células dendríticas, macrófagos, células endoteliales y basófilos, mientras que su ligando CD40L (CD154) es inducible en las células B y T activadas, entre otras. (Croft M y col., 2012). La señalización a través de la vía CD40 promueve la formación de CG, maduración de la afinidad de la molécula Ig y diferenciación hacia células B de memoria (Elgueta R y col., 2009). En nuestro estudio se observó aumento del porcentaje de células CD19+CD40+ en los individuos infectados asintomáticos (G0), pero el análisis del MFI de CD40 no mostro cambios entre los grupos infectados y respecto de los controles. En contraste, no se detectaron cambios en el porcentaje de células CD4+CD154+ en los infectados; sin embargo, los niveles de MFI de CD154 fueron mayores en individuos del grupo G0 respecto del grupo G1. La falta de correlación de la MFI de CD40 en células CD19+ con la MFI de CD154 en células CD4+ observada en los individuos infectados sugiere un fenómeno de desregulación de la vía CD154/CD40, que se desarrollaría previamente al desarrollo de sintomatología cardíaca. Otros autores han evaluado la expresión ex-vivo de CD40L en células T CD4+CD25+ (T regulatorias), no detectando diferencias entre individuos infectados asintomáticos, con enfermedad chagásica crónica cardíaca y controles, aunque describen aumento de células T CD4+CD25+CD40L+ luego de la estimulación con antígenos de *T. cruzi* in vitro (de Araújo FF y col., 2011). Es posible que la baja producción de anticuerpos específicos para *T. cruzi* observado en los ensayos de estimulación in

vitro en este trabajo se relacione con este último fenómeno a través de un mecanismo de regulación negativa de las células B de memoria específica.

La molécula CD27 es una glicoproteína trans-membrana presente en la superficie de los linfocitos B, T y NK activadas. El ligando de CD27 es la molécula CD70 expresada en la superficie de las linfocitos T CD4+ y CD8+, NK, B y dendríticas entre otras (Croft M y col., 2012). Mientras que la maduración de los linfocitos B a células de memoria involucra la interacción del receptor CD40 con su ligando CD154 expresado por los linfocitos T CD4+, la diferenciación a células plasmáticas y producción de Igs de larga vida depende de la interacción CD27/CD70 (Agematsu K, 2000; Jacquot S, 2000; Nolte MA y col., 2009). Utilizando ratones transgénicos que expresan constitutivamente CD70, Beishuizen y col. han descrito que la expresión de esta molécula induce la expresión de FasL en las células T y facilita su entrada en los folículos B. Las células T co-expresando CD70 y FasL interfieren con la diferenciación de células B induciendo su apoptosis e interfiriendo con la correcta formación del CG y producción de IgG. El tratamiento de los ratones transgénicos con un anticuerpo anti-CD40 no corrigió el defecto en la de producción de anticuerpos, sugiriendo que la regulación negativa de la respuesta IgG por sobreexpresión de CD70 no involucra la vía CD40/CD40L (Beishuizen CRL y col., 2009). En ensayos de estimulación in vitro de células T CD4+ aisladas de individuos con linfoma de células B no-Hodking se observó que el TGF- β induce la expresión de CD70 y regula negativamente la expresión de CD27 a través del mecanismo de clivaje, provocando el aumento de células T CD4+CD70+ y CD4+CD27-CD70+ y acumulación de sCD27 en el medio de cultivo. La liberación de sCD27 es atenuado por el tratamiento de los cultivos con anticuerpos anti-CD70, sugiriendo que el mecanismo de clivaje que conduce al agotamiento de células T CD4+ de memoria efectora es dependiente de la expresión de CD70 (Yang ZZ y col., 2014). En la infección experimental por *T. cruzi*, el análisis de TGF- β en tejidos cardiacos por RT-PCR mostro niveles normales, mientras por inmuno-histoquímica se detectó aumento del número de células TGF- β + (González MN y col., 2013; Zhang L y Tarleton RL, 1996). Estudios más recientes han demostrado

que los linfocitos B producen mayor expresión de TGF- β en la infección crónica humana independientemente del grado de compromiso cardíaco (Fares RCG y col., 2013;). Otros autores han demostrado además la participación del TGF- β en el desarrollo de la cardiomiopatía chagásica a través de la regulación de la invasión y ciclo intracelular del parásito, modulación de la respuesta inflamatoria, fibrosis y remodelación cardíaca (Araújo-Jorge TC y col., 2008). Es probable que la mayor expresión de CD70 en células T CD4⁺ periféricas de individuos asintomáticos observada en el presente trabajo se relacione con el aumento de la expresión de TGF- β descrito anteriormente.

En resumen, en este trabajo se demostró que la infección crónica por *T. cruzi* altera el perfil fenotípico del compartimiento celular B circulante en sangre periférica ex-vivo, con reducción de la población de memoria IgG e IgM clásica, células plasmáticas y células B precursoras, mayor expresión de CD40, aumento de las células de memoria CD27⁻ activadas (CD95⁺) y vírgenes, y limitada capacidad de producción de anticuerpos específicos contra el parásito in vitro. También se demostró aumento de la expresión de CD70 y CD154 en población T CD4⁺ y reducción de células T CD4⁺CD27⁺, indicando la posible participación de un mecanismo de desregulación que afecta ambas poblaciones celulares. Esta desregulación podría ser responsable de la generación de una respuesta humoral y celular defectiva que interfiere con la eliminación del *T. cruzi*, resultando en persistencia parasitaria y generación de un proceso inflamatorio crónico a nivel de los tejidos afectados.

CONCLUSION

6.CONCLUSION

Los resultados presentados en este trabajo de tesis han permitido ampliar el conocimiento acerca del impacto de la infección por *T. cruzi* sobre el perfil fenotípico de la población celular B y su relación con la población de linfocitos T CD4+ circulantes en sangre periférica de individuos crónicamente infectados por el parásito.

- La evaluación de las 4 principales poblaciones de los linfocitos B circulante demostró por primera vez que la infección crónica por *T. cruzi* induce la disminución de células CD19+CD27+IgD+/- y aumento de las células CD19+CD27-IgD+.
- El análisis de la expresión diferencial de IgD, IgG e IgM reveló la participación de subpoblaciones celulares B en distintos estadios de maduración y diferenciación en el estrechamiento de la población de células CD19+CD27+:
 - Células B de memoria IgG+ clásica, IgM+ y con cambio de isotipo (IgM-).
 - Células B precursoras.
 - Células plasmáticas.
- La expresión diferencial de IgD, IgG e IgM también permitió identificar expansión de subpoblaciones celulares con diferente funcionalidad que comparten el fenotipo CD19+CD27-.
 - Células B vírgenes IgM+IgD+.
 - Células B de memoria IgG+IgD-.
- El análisis de la expresión de CD27 en la población de células T CD4+ mostró marcada reducción de células CD4+CD27+.

- La correlación entre la disminución de células T CD4+CD27+ y CD19+CD27+, en ausencia de cambios en la población de células IgM+CD27+IgD+ sugiere que la reducción de células B CD27+ resulta de una deficiente respuesta T CD4+.
- Como la contracción de las células CD19+CD27+ precede el desarrollo de signos clínicos de compromiso cardíaco y la pérdida de células T específicas para *T. cruzi* secretoras de IFN- γ se asocia a estadios más avanzados de la enfermedad, también es posible que la alteración en las células B sea la causa de la desregulación de la respuesta celular T.
- Los ensayos de estimulación de PBMC in vitro mostraron que las células B de memoria que persisten en la circulación responden exageradamente a un estímulo policlonal pero son incapaces de generar una respuesta IgG específica sustancial, apoyando la hipótesis de que la mayoría de las células B circulantes no son específicas para el parásito propuesta por otros autores.
- El aumento de células CD19+ CD40+ y la mayor expresión de CD154 y CD70 en los linfocitos T CD4+ de los individuos asintomáticos indican la existencia de un fenómeno de desregulación a nivel de la co-señalización celular B – T.
- La ausencia de cambios significativos en los niveles de sCD27 en estadios asintomático y con alteraciones electrocardiográficas leves indica la baja probabilidad de que las metaloproteasas ejerzan un rol importante en la disminución del receptor CD27 de membrana de los linfocitos.
- Los individuos con cardiomiopatía chagásica crónica tienen elevados niveles séricos de sCD27, indicando su potencial valor como marcador inmunológico de progresión de la enfermedad en áreas endémicas.

REFERENCIAS

7.REFERENCIAS

Abreu MT, Carvalheiro H, Rodrigues-Sousa T, Domingos A, Segorbe-Luis A, Rodrigues-Santos P, Souto-Carneiro MM. Alterations in the peripheral blood B cell subpopulations of multidrug-resistant tuberculosis patients. *Clin Exp Med*. 2013 Sep 26.

Acosta-Rodríguez EV, Merino MC, Montes CL, Motrán CC, Gruppi A. Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007 Feb-Apr; 18(1-2):73-83.

Agematsu K, Kobata T, Yang FC, Nakazawa T, Fukushima K, Kitahara M, Mori T, Sugita K, Morimoto C, Komiyama A. CD27/CD70 interaction directly drives B cell IgG and IgM synthesis. *Eur J Immunol*. 1995 Oct; 25(10):2825-9.

Agematsu K, Nagumo H, Yang FC, Nakazawa T, Fukushima K, Ito S, Sugita K, Mori T, Kobata T, Morimoto C, Komiyama A. B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur J Immunol*. 1997 Aug; 27(8):2073-9.

Agematsu K. Memory B cells and CD27. *Histol Histopathol*. 2000 Apr; 15(2):573-6.

Aiba Y, Kometani K, Hamadate M, Moriyama S, Sakaue-Sawano A, Tomura M, Luche H, Fehling HJ, Casellas R, Kanagawa O, Miyawaki A, Kurosaki T. Preferential localization of IgG memory B cells adjacent to contracted germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 6; 107(27):12192-7.

Alba Soto CD, Mirkin GA, Solana ME, González Cappa SM. *Trypanosoma cruzi* infection modulates in vivo expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. *Infect Immun*. 2003 Mar; 71(3):1194-9.

Albareda MC, Laucella SA, Alvarez MG, Armenti AH, Bertochi G, Tarleton RL, Postan M. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol*. 2006 Mar; 18(3):465-71.

Albareda MC, Olivera GC, Laucella SA, Alvarez MG, Fernandez ER, Lococo B, Viotti R, Tarleton RL, Postan M. Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4+ T cells to immune senescence. *J Immunol*. 2009 Sep 15; 183(6):4103-8.

Almeida IC, Milani SR, Gorin PA, Travassos LR. Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J Immunol*. 1991 Apr 1; 146(7):2394-400.

Altcheh J, Moscatelli G, Moroni S, Garcia-Bournissen F, Freilij H. Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas disease. *Pediatrics*. 2011 Jan; 127(1):e212-8.

Alvarez MG, Postan M, Weatherly DB, Albareda MC, Sidney J, Sette A, Olivera C, Armenti AH, Tarleton RL, Laucella SA. HLA Class I-T cell epitopes from trans-sialidase proteins reveal functionally distinct subsets of CD8+ T cells in chronic Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2(9):e288.

Andrade SG, Freitas LA, Peyrol S, Pimentel AR, Sadigursky M. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. *Bull World Health Organ* 1991; 69:191-7.

Anolik JH, Looney RJ, Lund FE, Randall TD, Sanz I. Insights into the heterogeneity of human B cells: diverse functions, roles in autoimmunity, and use as therapeutic targets. *Immunol Res*. 2009 Dec; 45(2-3):144-58.

Araujo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, Correa-Oliveira R. Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci.* 2007 May 1; 12:2797-806.

Araujo FG. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids. *Infect Immun.* 1986 Jul; 53(1):179-185.

Araujo-Jorge TC, Waghabi MC, Soeiro Mde N, Keramidas M, Bailly S, Feige JJ. Pivotal role for TGF-beta in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic myocardiopathy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008 Oct-Dec; 19(5-6):405-13.

Atlas A, Thanh Ha TT, Lindström A, Nilsson A, Alaeus A, Chiodi F, De Milito A. Effects of potent antiretroviral therapy on the immune activation marker soluble CD27 in patients infected with HIV-1 subtypes A-D. *J Med Virol.* 2004 Mar; 72(3):345-51

Avalos AM, Meyer-Wentrup F, Ploegh HL. B-cell receptor signaling in lymphoid malignancies and autoimmunity. *Adv Immunol.* 2014; 123:1-49

Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol.* 2002 Jul; 3(7):619-26.

Bao Y, Cao X. The immune potential and immunopathology of cytokine-producing B cell subsets: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2014 Apr 30. pii: S0896-8411(14)00080-8.

Beishuizen CR, Kragten NA, Boon L, Nolte MA, van Lier RA, van Gisbergen KP. Chronic CD70-driven costimulation impairs IgG responses by instructing T cells to inhibit germinal center B cell formation through FasL-Fas interactions. *J Immunol.* 2009 Nov 15; 183(10):6442-51.

Benson MJ, Elgueta R, Schpero W, Molloy M, Zhang W, Usherwood E, Noelle RJ. Distinction of the memory B cell response to cognate antigen versus bystander inflammatory signals. *J Exp Med.* 2009 Aug 31; 206(9):2013-25.

Berkowska MA, Driessen GJ, Bikos V, Grosserichter-Wagener C, Stamatopoulos K, Cerutti A, He B, Biermann K, Lange JF, van der Burg M, van Dongen JJ, van Zelm MC. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood.* 2011 Aug 25; 118(8):2150-8.

Bermejo DA, Amezcua Vesely MC, Khan M, Acosta Rodríguez EV, Montes CL, Merino MC, Toellner KM, Mohr E, Taylor D, Cunningham AF, Gruppi A. *Trypanosoma cruzi* infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. *Immunology.* 2011 Jan; 132(1):123-33.

Bermejo DA, Jackson SW, Gorosito-Serran M, Acosta-Rodríguez EV, Amezcua-Vesely MC, Sather BD, Singh AK, Khim S, Mucci J, Liggitt D, Campetella O, Oukka M, Gruppi A, Rawlings DJ. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR γ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nat Immunol.* 2013 May; 14(5):514-22.

Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Dantas RO, Maguire JH, Acquatella H, Morillo C, Kirchhoff LV, Gilman RH, Reyes PA, Salvatella R, Moore AC. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA.* 2007 Nov 14; 298(18):2171-81.

Blanco SB, Segura EL, Gürtler RE. Control of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina. *Medicina (B Aires).* 1999; 59 Suppl 2:138-142.

Boainain E, Rassi A. Etiologic therapy of Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol.* 1979 32:395-9.

- Bohnhorst JØ, Bjørgan MB, Thoen JE, Jonsson R, Natvig JB, Thompson KM. Abnormal B cell differentiation in primary Sjögren's syndrome results in a depressed percentage of circulating memory B cells and elevated levels of soluble CD27 that correlate with Serum IgG concentration. *Clin Immunol.* 2002 Apr; 103(1):79-88.
- Bryan MA, Guyach SE, Norris KA. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Jul 6; 4(7):e733.
- Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, Cura C, Brusses B, Favalaro L, Leguizamon MS, Lucero RH, Laguens R, Levin MJ, Favalaro R, Schijman AG. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis.* 2010 Sep 1; 51(5):485-95.
- Cagigi A, Du L, Dang LV, Grutzmeier S, Atlas A, Chiodi F, Pan-Hammarström Q, Nilsson A. CD27(-) B-cells produce class switched and somatically hyper-mutated antibodies during chronic HIV-1 infection. *PLoS One.* 2009; 4(5):e5427.
- Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM, Bos NA, Johnsen HE, Orfao A, Perez-Andres M; Myeloma Stem Cell Network. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica.* 2010 Jun; 95(6):1016-20.
- Cardillo F, Postol E, Nihei J, Aroeira LS, Nomizo A, Mengel J. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology.* 2007 Dec; 122(4):584-95.
- Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun.* 1996 64:128-134.
- Cariappa A, Chase C, Liu H, Russell P, Pillai S. Naive recirculating B cells mature simultaneously in the spleen and bone marrow. *Blood.* 2007 Mar 15; 109(6):2339-45.
- Cerban FM, Gea S, Menso E, Vottero-Cima E. Chagas' disease: IgG isotypes against *Trypanosoma cruzi* cytosol acidic antigens in patients with different degrees of heart damage. *Clin Immunol Immunopathol.* 1993 Apr; 67(1):25-30.
- Cerisola JA, Neves da Silva N, Prata A, Schenone H, Rohwedder R. Evaluation of the efficacy of nifurtimox in chronic human chagasic infection by using xenodiagnosis (author's transl)]. *Bol Chil Parasitol.* 1977 Jul-Dec; 32(3-4):51-62.
- Clark EA, Ledbetter JA. How B and T cells talk to each other. *Nature.* 1994 Feb 3; 367(6462):425-8.
- Côbo E de C, Silveira TP, Micheletti AM, Crema E, Adad SJ. Research on *Trypanosoma cruzi* and Analysis of Inflammatory Infiltrate in Esophagus and Colon from Chronic Chagasic Patients with and without Mega. *J Trop Med.* 2012; 2012:232646.
- Cordeiro FD, Martins-Filho OA, Da Costa Rocha MO, Adad SJ, Corrêa-Oliveira R, Romanha AJ. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001 Jan; 8(1):112-8.
- Correa-Oliveira R, Gomes J, Lemos EM, Cardoso GM, Reis DD, Adad S, Crema E, Martins-Filho OA, Costa MO, Gazzinelli G, Bahia-Oliveira LM. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94 Suppl 1:253-5.

- Cosmi L, Maggi L, Santarlaschi V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A*. 2014 Jan; 85(1):36-42.
- Criteria Committee of the New York Heart Association. Nomenclature and criteria for diagnosis of the heart and great vessels. 6.ed. Boston, Little Brown 1964 1-23.
- Croft M, Duan W, Choi H, Eun SY, Madireddi S, Mehta A. TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights. *Trends Immunol*. 2012 Mar; 33(3):144-52.
- Crotty S, Ahmed R. Immunological memory in humans. *Semin Immunol*. 2004 Jun; 16(3):197-203.
- Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul; 104 Suppl 1:252-8.
- Cunha-Neto E, Teixeira PC, Nogueira LG, Kalil J. Autoimmunity. *Adv Parasitol*. 2011; 76:129-52.
- Cuss AK, Avery DT, Cannons JL, Yu LJ, Nichols KE, Shaw PJ, Tangye SG. Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity. *J Immunol*. 2006 Feb 1; 176(3):1506-16.
- da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, Silva JS. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Feb 16; 4(2):e604.
- de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG, Martelli CM. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*. 1996 Nov 23; 348(9039):1407-13.
- de Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PR, Assis Silva Gomes J, Sathler-Avelar R, Otávio Costa Rocha M, Elói-Santos SM, Pinho RT, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(5):e992
- De Milito A, Mörch C, Sönnnerborg A, Chiodi F. Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection. *AIDS*. 2001 May 25; 15(8):957-64.
- de Rissio AM, Scollo K, Cardoni RL. Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina. *Medicina (B Aires)*. 2009; 69(5):529-535.
- Dekkers PE, ten Hove T, Lauw FN, Koene HR, Lumley P, van Deventer SJ, van der Poll T. The metalloproteinase inhibitor GI5402 inhibits endotoxin-induced soluble CD27 and CD16 release in healthy humans. *Infect Immun*. 2000 May; 68(5):3036-9.
- Dhiman M, Zago MP, Nunez S, Amoroso A, Rementeria H, Dousset P, Nunez Burgos F, Garg NJ. Cardiac-oxidized antigens are targets of immune recognition by antibodies and potential molecular determinants in chagas disease pathogenesis. *PLoS One*. 2012; 7(1):e28449.
- Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, Delbos F, Mégret J, Storck S, Reynaud CA, Weill JC. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol*. 2009 Dec; 10(12):1292-9.
- Dunn-Walters DK, Isaacson PG, Spencer J. Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. *J Exp Med*. 1995 Aug 1; 182(2):559-66.
- Dutra WO, Colley DG, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Brener Z, Pereira ME, Coffman RL, Correa-Oliveira R, Carvalho-Parra JF. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion

- of CD5+ B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. *Scand J Immunol.* 2000 Jan; 51(1):91-7.
- Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2008 Jun; 21(3):287-92.
- Dutra WO, Martins-Filho OA, Cançado JR, Pinto-Dias JC, Brener Z, Gazzinelli G, Carvalho JF, Colley DG. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 1996 Jan; 43(1):88-93.
- Dutra WO, Martins-Filho OA, Cançado JR, Pinto-Dias JC, Brener Z, Freeman Júnior GL, Colley DG, Gazzinelli G, Parra JC. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int Immunol.* 1994 Apr; 6(4):499-506.
- Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev.* 2009 May; 229(1):152-72.
- Fabbro DL, Streiger ML, Arias ED, Bizai ML, del Barco M, Amicone NA. 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. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007. 40:1–10.
- Fairfax KA, Kallies A, Nutt SL, Tarlinton DM. Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches. *Semin Immunol.* 2008 Feb; 20(1):49-58.
- Fares RC, Correa-Oliveira R, de Araújo FF, Keesen TS, Chaves AT, Fiuza JA, Ferreira KS, Rocha MO, Gomes JA. Identification of phenotypic markers of B cells from patients with Chagas disease. *Parasite Immunol.* 2013 Jul; 35(7-8):214-23.
- Fecteau JF, Côté G, Néron S. A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J Immunol.* 2006 Sep 15; 177(6):3728-36.
- Fiuza JA, Fujiwara RT, Gomes JA, Rocha MO, Chaves AT, de Araújo FF, Fares RC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Cançado GG, Correa-Oliveira R. Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009 Sep 9; 3(9):e512.
- Flechas ID, Cuellar A, Cucunubá ZM, Rosas F, Velasco V, Steindel M, Thomas Mdel C, López MC, González JM, Puerta CJ. Characterising the KMP-11 and HSP-70 recombinant antigens' humoral immune response profile in chagasic patients. *BMC Infect Dis.* 2009 Nov 25; 9:186.
- Font J, Pallares L, Martorell J, Martinez E, Gaya A, Vives J, Ingelmo M. Elevated soluble CD27 levels in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996 Dec; 81(3):239-43.
- Garside P, Ingulli E, Merica RR, Johnson JG, Noelle RJ, Jenkins MK. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science.* 1998 Jul 3; 281(5373):96-9.
- Gatto D, Brink R. The germinal center reaction. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Nov; 126(5):898-907; quiz 908-9. doi: 10.1016/j.jaci.2010.09.007.
- Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest.* 2004 Nov; 114(10):1379-88.
- Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 2003 Mar; 71(3):1185-93.

- González Cappa SM, Sanz OP, Muller LA, Molina HA, Fernandez J, Rimoldi MT, Sica RE. Peripheral nervous system damage in experimental chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1987 36:41-5.
- González MN, Dey N, Garg NJ, Postan M. Granulocyte colony-stimulating factor partially repairs the damage provoked by *Trypanosoma cruzi* in murine myocardium. *Int J Cardiol.* 2013 Oct 3; 168(3):2567-74.
- González-Amaro R, Cortés JR, Sánchez-Madrid F, Martín P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med.* 2013 Oct; 19(10):625-32.
- Good KL, Avery DT, Tangye SG. Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J Immunol.* 2009 Jan 15; 182(2):890-901.
- Grauert MR, Houdayer M, Hontebeyrie-Joskowicz M. *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease. *Clin Exp Immunol.* 1993 Jul; 93(1):85-92.
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:515-48.
- Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-. *J Exp Med.* 2011 Jan 17; 208(1):67-80.
- Heaps A, Varney V, Bhaskaran S, Ford B, Mosley A, Ross Sadler⁴, Lisa Ayers⁴, Jane Evans², Amena Warner¹, Grant Hayman¹, Amolak Bansal¹ and Nazira Sumar¹. Patients with Chronic Sarcoidosis have Reduced CD27+IgM+IgD+ Unswitched Memory B cells and an Expanded Population of Terminal Effector CD8+CD27-CD28- T cells. *J Clin Cell Immunol* 2012 3:132.
- Hernández-Becerril N, Nava A, Reyes PA, Monteón VM. IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. *Arch Cardiol Mex.* 2001 Jul-Sep; 71(3):199-205.
- Hiepe F, Dörner T, Hauser AE, Hoyer BF, Mei H, Radbruch A. Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation. *Nat Rev Rheumatol.* 2011 Mar; 7(3):170-8.
- Hintzen RQ, de Jong R, Hack CE, Chamuleau M, de Vries EF, ten Berge IJ, Borst J, van Lier RA. A soluble form of the human T cell differentiation antigen CD27 is released after triggering of the TCR/CD3 complex. *J Immunol.* 1991 Jul 1; 147(1):29-35.
- Huang J, Jochems C, Anderson AM, Talaie T, Jales A, Madan RA, Hodge JW, Tsang KY, Liewehr DJ, Steinberg SM, Gulley JL, Schlom J. Soluble CD27-pool in humans may contribute to T cell activation and tumor immunity. *J Immunol.* 2013 Jun 15; 190(12):6250-8.
- INCOSUR, Paraguay, Organización Panamericana de la Salud. XI reunión. Informe 2002.
- Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, Szabolcs PM, Bernstein SH, Magro CM, Williams AD, Hall RP, St Clair EW, Tedder TF. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood.* 2011 Jan 13; 117(2):530-41.
- Jacobi AM, Reiter K, Mackay M, Aranow C, Hiepe F, Radbruch A, Hansen A, Burmester GR, Diamond B, Lipsky PE, Dörner T. Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum.* 2008 Jun; 58(6):1762-73.
- Jacquot S, Kobata T, Iwata S, Morimoto C, Schlossman SF. CD154/CD40 and CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T cell-dependent B cell responses:

- enhancement of plasma cell differentiation by CD27 signaling. *J Immunol.* 1997 Sep 15; 159(6):2652-7.
- Kaminski DA, Wei C, Qian Y, Rosenberg AF, Sanz I. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front Immunol.* 2012 Oct 10; 3:302.
- Kato K, Chu P, Takahashi S, Hamada H, Kipps TJ. Metalloprotease inhibitors block release of soluble CD27 and enhance the immune stimulatory activity of chronic lymphocytic leukemia cells. *Exp Hematol.* 2007 Mar; 35(3):434-42.
- Keesen TS, Gomes JA, Fares RC, de Araújo FF, Ferreira KS, Chaves AT, Rocha MO, Correa-Oliveira R. Characterization of CD4⁺ cytotoxic lymphocytes and apoptosis markers induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol.* 2012 Sep; 76(3):311-9.
- Khokha R, Murthy A, Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013 Sep; 13(9):649-65.
- Kierszenbaum F, Howard JG. Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *J Immunol.* 1976. 116:1208-11.
- Kierszenbaum F, Knecht E, budzko DB, Pizzimenti MC. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 1974. 112:1839-44.
- Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD⁺ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med.* 1998 Nov 2; 188(9):1679-89.
- Köberle F. The causation and importance of nervous lesions in American trypanosomiasis. *Bull World Health Organ.* 1970; 42(5):739-743.
- Krettli AU, Brener Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol.* 1976 Mar; 116(3):755-60.
- Krettli AU. The utility of anti-trypomastigote lytic antibodies for determining cure of *Trypanosoma cruzi* infections in treated patients: an overview and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Jul; 104 Suppl 1:142-51.
- Kumar S, Tarleton RL. The relative contribution of antibody production and CD8⁺ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 1998 May; 20(5):207-16
- Kuschnir E, Sgammini H, Castro R, Evequoz C, Ledesma R, Brunetto J. Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arq Bras Cardiol.* 1985; 45:249-256.
- Lafferty KJ, Cunningham AJ. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1975 Feb; 53(1):27-42.
- Lanzavecchia A, Bove S. Specific B lymphocytes efficiently pick up, process and present antigen to T cells. *Behring Inst Mitt.* 1985 Aug; (77):82-7.
- Laranja FS, Dias, E, Nobrega, G, Miranda, A. Chagas Disease. A clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation.* 1956; 14(6):1035-1060.
- Laucella SA, Postan M, Martin D, Hubby Fralish B, Albareda MC, Alvarez MG, Lococo B, Barbieri G, Viotti RJ, Tarleton RL. Frequency of interferon- gamma -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis.* 2004 Mar 1; 189(5):909-18.

- Lee J, Kuchen S, Fischer R, Chang S, Lipsky PE. Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population. *J Immunol*. 2009 Apr 1; 182(7):4116-26.
- Lee NS, Barber L, Akula SM, Sigounas G, Kataria YP, Arce S. Disturbed homeostasis and multiple signaling defects in the peripheral blood B-cell compartment of patients with severe chronic sarcoidosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2011 Aug; 18(8):1306-16.
- Ley Pesquisa Neonatal. Ley 26.279 en Argentina. Régimen para la detección y posterior tratamiento de determinadas patologías en el recién nacido. Sancionada: Agosto 8 de 2007.
- Loenen WA, De Vries E, Gravestein LA, Hintzen RQ, Van Lier RA, Borst J. The CD27 membrane receptor, a lymphocyte-specific member of the nerve growth factor receptor family, gives rise to a soluble form by protein processing that does not involve receptor endocytosis. *Eur J Immunol*. 1992 Feb; 22(2):447-55.
- Lorena VM, Lorena IM, Braz SC, Melo AS, Melo MF, Melo MG, Silva ED, Ferreira AG, Morais CN, Costa VM, Correa-Oliveira R, Gomes YM. Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol*. 2010 Dec; 72(6):529-39.
- Losavio A, Jones MC, Sanz OP, Mirkin G, Gonzalez Cappa SM, Muchnik S, Sica REP. A sequential study of the peripheral nervous system involvement in experimental Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1989. 41:539-47.
- Luger EO, Fokuhl V, Wegmann M, Abram M, Tillack K, Achatz G, Manz RA, Worm M, Radbruch A, Renz H. Induction of long-lived allergen-specific plasma cells by mucosal allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Oct; 124(4):819-26.e4.
- Machado FS, Aliberti J. Impact of lipoxin-mediated regulation on immune response to infectious disease. *Immunol Res*. 2006; 35(3):209-18.
- Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, Weiss LM, Nagajyothi F, Tanowitz HB, Garg NJ. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol*. 2012 Nov; 34(6):753-70.
- Malchiodi EL, Chiaramonte MG, Taranto NJ, Zwirner NW, Margni RA. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). *Clin Exp Immunol*. 1994 Sep; 97(3):417-423.
- Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, Green A, Perdrix A, Boyer O, Contentin N, Tilly H, Tron F, Vannier JP, Jacquot S. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol*. 2008 Apr; 127(1):14-25.
- Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Morillo CA, Avezum A, Connolly SJ, Sosa-Estani S, Rosas F, Yusuf S; BENEFIT Investigators. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J*. 2008 Jul; 156(1):37-43.
- Maurer D, Fischer GF, Fae I, Majdic O, Stuhlmeier K, Von Jeney N, Holter W, Knapp W. IgM and IgG but not cytokine secretion is restricted to the CD27+ B lymphocyte subset. *J Immunol*. 1992 Jun 15; 148(12):3700-5
- Maya JD, Repetto Y, Agosin M, Ojeda JM, Tellez R, Gaule C, Morello A. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1997. 86:101-6.

- Mazza, S. La enfermedad de Chagas en al República Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1949. 47:273.
- McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L. Molecular programming of B cell memory. Nat Rev Immunol. 2011 Dec 9; 12(1):24-34.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature. 2007 Oct 18; 449(7164):819-26.
- Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación, Secretaría de Programas de Salud. Normas para el Diagnóstico de infección chagásica. Resolución Ministerial 523/97. Buenos Aires, Argentina, 1997.
- Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Andrade L, Hontebeyrie-Joskowicz M, Coutinho A. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. Scand J Immunol. 1988 Nov; 28(5):553-61.
- Minoprio P, Itohara S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. Immunol Rev. 1989 Dec; 112:183-207.
- Mittrücker HW, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+T Cells. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2014 May 31
- Mohsenzadegan M, Fattahi F, Fattahi F, Mirshafiey A, Fazlollahi MR, Naderi Beni F, Movahedi M, Pourpak Z. Altered Pattern of Naïve and Memory B cells and B1 Cells in Patients with Chronic Granulomatous Disease. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2014 Jun; 13(3):157-65.
- Moir S, De Ravin SS, Santich BH, Kim JY, Posada JG, Ho J, Buckner CM, Wang W, Kardava L, Garofalo M, Marciano BE, Manischewitz J, King LR, Khurana S, Chun TW, Golding H, Fauci AS, Malech HL. Humans with chronic granulomatous disease maintain humoral immunologic memory despite low frequencies of circulating memory B cells. Blood. 2012 Dec 6; 120(24):4850-8.
- Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O'Shea MA, Roby G, Kottlil S, Arthos J, Proschan MA, Chun TW, Fauci AS. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. J Exp Med. 2008 Aug 4; 205(8):1797-805
- Morgan J, Dias JC, Gontijo ED, Bahia-Oliveira L, Correa-Oliveira R, Colley DG, Powell MR. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg. 1996 Oct; 55(4):355-9
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol. 1989 7:145-73.
- Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, Slansky J, Ahmed R. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. Immunity. 1998 Feb; 8(2):177-87.
- Murray DA, Crispe IN. TNF-alpha controls intrahepatic T cell apoptosis and peripheral T cell numbers. J Immunol. 2004 Aug 15; 173(4):2402-9.
- Nolte MA, van Olfen RW, van Gisbergen KP, van Lier RA. Timing and tuning of CD27-CD70 interactions: the impact of signal strength in setting the balance between adaptive responses and immunopathology. Immunol Rev. 2009 May; 229(1):216-31.
- Nunes DF, Guedes PM, Andrade Cde M, Câmara AC, Chiari E, Galvão LM. Troponin T autoantibodies correlate with chronic cardiomyopathy in human Chagas disease. Trop Med Int Health. 2013 Oct; 18(10):1180-92.

- Obino D, Lennon-Duménil AM. A critical role for cell polarity in antigen extraction, processing, and presentation by B lymphocytes. *Adv Immunol.* 2014; 123:51-67.
- OMS (World Health Organization) Technical Report Series 905. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee, Geneva 2002.
- OMS (World Health Organization), Chagas disease (American trypanosomiasis), 2014 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
- Oracki SA, Walker JA, Hibbs ML, Corcoran LM, Tarlinton DM. Plasma cell development and survival. *Immunol Rev.* 2010 Sep; 237(1):140-59.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS/HDM/CD/425-06). Estimación cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en Las Américas. 2006; pág. 6-7.
- Oshima H, Nakano H, Nohara C, Kobata T, Nakajima A, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Muto T, Yagita H, Okumura K. Characterization of murine CD70 by molecular cloning and mAb. *Int Immunol.* 1998 Apr; 10(4):517-26.
- Pape KA, Catron DM, Itano AA, Jenkins MK. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity.* 2007 Apr; 26(4):491-502.
- Pape KA, Taylor JJ, Maul RW, Gearhart PJ, Jenkins MK. Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science.* 2011 Mar 4; 331(6021):1203-7.
- Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med.* 1994 Jul 1; 180(1):329-39.
- Patuzzo G, Mazzi F, Vella A, Ortolani R, Barbieri A, Tinazz E, Marchi G, Codella O, Beri R, Puccetti A, Lunardi C. Immunophenotypic Analysis of B Lymphocytes in Patients with Common Variable Immunodeficiency: Identification of CD23 as a Useful Marker in the Definition of the Disease. *ISRN Immunology.* 2013
- Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, Vogt RF Jr, Marti GE, Rawstron AC, Van Zelm MC, Van Dongen JJ, Johnsen HE, Klein B, Orfao A; Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010; 78 Suppl 1:S47-60.
- Perez-Mazliah DE, Alvarez MG, Cooley G, Lococo BE, Bertocchi G, Petti M, Albareda MC, Armenti AH, Tarleton RL, Laucella SA, Viotti R. Sequential combined treatment with allopurinol and benznidazole in the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a pilot study. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Feb; 68(2):424-37.
- Piedras J, Gutierrez S, Reyes-López PA, Reyes K, López-Karpovitch X, Monteón V. Circulating lymphocyte subpopulations and activated T and B cells in patients with chagasic and non-chagasic myocardopathy. *Cytometry.* 1997 Feb 15; 30(1):28-32.
- Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, Debré P, Schmitt C, Oksenhendler E. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol.* 2003 Sep; 23(5):385-400.
- Poncini CV, Alba Soto CD, Batalla E, Solana ME, González Cappa SM. *Trypanosoma cruzi* induces regulatory dendritic cells in vitro. *Infect Immun.* 2008 Jun; 76(6):2633-41.
- Portegies P, Godfried MH, Hintzen RQ, Stam J, van der Poll T, Bakker M, van Deventer SJ, van Lier RA, Goudsmit J. Low levels of specific T cell activation marker CD27 accompanied by elevated

- levels of markers for non-specific immune activation in the cerebrospinal fluid of patients with AIDS dementia complex. *J Neuroimmunol.* 1993 Nov-Dec; 48(2):241-7.
- Programa Nacional de Garantía de Calidad de la Atención Médica del Ministerio de Salud. Guías para la atención del paciente infectado con *T. cruzi*, Resolución 1870/2006 Ministerio de Salud de la Nación.
- Ramírez G, Valck C, Molina MC, Ribeiro CH, López N, Sánchez G, Ferreira VP, Billetta R, Aguilar L, Maldonado I, Cattán P, Schwaeble W, Ferreira A. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. *Immunobiology.* 2011 Jan-Feb; 216(1-2):265-73.
- Rassi A Jr, Rassi A, Little WC. Chagas' Heart Disease. *Clin. Cardiol.* 2000; 23:883-889.
- Rau FC, Dieter J, Luo Z, Priest SO, Baumgarth N. B7-1/2 (CD80/CD86) direct signaling to B cells enhances IgG secretion. *J Immunol.* 2009 Dec 15; 183(12):7661-71.
- Reis DD, Gazzinelli RT, Gazzinelli G, Colley DG. Antibodies to *Trypanosoma cruzi* express idiotypic patterns that can differentiate between patients with asymptomatic or severe Chagas' disease. *J Immunol.* 1993a Feb 15; 150(4):1611-8.
- Reis DD, Jones EM, Tostes S Jr, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 1993b May; 48(5):637-44.
- Reynaud CA, Descatoire M, Dogan I, Huetz F, Weller S, Weill JC. IgM memory B cells: a mouse/human paradox. *Cell Mol Life Sci.* 2012 May; 69(10):1625-34.
- Riarte A. TRAENA TRAtamiento con Benznidazol EN pacientes adultos con enfermedad de Chagas crónica. Un ensayo clínico aleatorizado a doble ciego en Fase 3. 2013 [Libro en línea] XXVI REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE PROTOZOLOGÍA [fecha de consulta: 12 de Febrero 2014]. Disponible en <<http://ebookbrowse.net/sap-2013-pdf-d609639490>>.
- Rodrigues V Jr, Agrelli GS, Leon SC, Silva Teixeira DN, Tostes S Jr, Rocha-Rodrigues DB. Fas/Fas-L expression, apoptosis and low proliferative response are associated with heart failure in patients with chronic Chagas' disease. *Microbes Infect.* 2008 Jan; 10(1):29-37.
- Rosenbaum MB, Cerisola JA. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en la República Argentina. *Hospital.* 1961. 60: 55-100.
- Rosenbaum MB. Chagasic Myocardiopathy. *Prog Cardiovasc Dis.* 1964; 7:199-225.
- Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, Quach TD, Kaku H. Human B-1 cells take the stage. *Ann N Y Acad Sci.* 2013 May; 1285:97-114.
- Rottenberg ME, Cardoni R, Andersson R, Segura E, Orn A. Resistance to *Trypanosoma cruzi* requires T helper/inducer cells as well as natural killer cells. *Scand J Immunol.* 1988. 28:573.
- Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, Candia N, Calcena MF, Figueredo A. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1998. 59:487-91.
- Sagaert X, De Wolf-Peeters C. Classification of B-cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localisation and their developmental lineage. *Immunol Lett.* 2003 Dec 15; 90(2-3):179-86.

- Sanz I, Wei C, Lee FE, Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin Immunol.* 2008 Feb; 20(1):67-82.
- Sathler-Avelar R, Lemos EM, Reis DD, Medrano-Mercado N, Araújo-Jorge TC, Antas PR, Corrêa-Oliveira R, Teixeira-Carvalho A, Elói-Santos SM, Favato D, Martins-Filho OA. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol.* 2003 Dec; 58(6):655-63
- Sathler-Avelar R, Marquete Vitelli-Avelar D, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 2009; Vol. 104(Suppl. I):246-251.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella. The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology.* 2006. 12:583-588.
- Scott MT, Goss-Sampson M. Restricted IgG isotype profiles in *T. cruzi* infected mice and Chagas' disease patients. *Clin Exp Immunol.* 1984 Nov; 58(2):372-9.
- Seifert M, Küppers R. Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation. *J Exp Med.* 2009 Nov 23; 206(12):2659-69. doi: 10.1084/jem.20091087.
- Shipkova M, Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin Chim Acta.* 2012 Sep 8; 413(17-18):1338-49.
- Sica RE, Filipini D, Panizza M, Fumo T, Baso S, Lazzari J, Molina HA. Involvement of the peripheral sensory nervous system in human chronic Chagas disease. *Medicina (Buenos Aires)* 1986. 46:662-668.
- Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood.* 2005 Jun 1; 105(11):4390-8.
- Smith KG, Hewitson TD, Nossal GJ, Tarlinton DM. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur J Immunol.* 1996 Feb; 26(2):444-8.
- Snapper CM, Yamada H, Smoot D, Sneed R, Lees A, Mond JJ. Comparative in vitro analysis of proliferation, Ig secretion, and Ig class switching by murine marginal zone and follicular B cells. *J Immunol.* 1993 Apr 1; 150(7):2737-45.
- Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1998. 59:526-9.
- Sosa Estani S, Segura EL. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the indeterminate phase: experience and current guidelines in Argentina. *Medicina (B Aires).* 1999. 2:166-70.
- Souto-Carneiro MM, Mahadevan V, Takada K, Fritsch-Stork R, Nanki T, Brown M, Fleisher TA, Wilson M, Goldbach-Mansky R, Lipsky PE. Alterations in peripheral blood memory B cells in patients with active rheumatoid arthritis are dependent on the action of tumour necrosis factor. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11(3):R84.
- Souza PE, Rocha MO, Menezes CA, Coelho JS, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun.* 2007 Apr; 75(4):1886-94.
- Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display

- distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun*. 2004 Sep; 72(9):5283-91.
- Stempin C, Giordanengo L, Gea S, Cerbán F. Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *J Leukoc Biol*. 2002 Oct; 72(4):727-34.
- Stempin CC, Dulgerian LR, Garrido VV, Cerban FM. Arginase in parasitic infections: macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010:683485
- Stoppani A. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)*, 1999. 59: 147-165.
- Suryani S, Tangye SG. Therapeutic implications of advances in our understanding of transitional B-cell development in humans. *Expert Rev Clin Immunol*. 2010 Sep; 6(5):765-75.
- Tadmor T, Polliack A. Elevated soluble CD 27 levels (TNF-receptor) may predict survival in diffuse large B-cell lymphoma--revisiting "the super-family" saga. *Leuk Lymphoma*. 2012 Aug; 53(8):1439-40.
- Takahashi Y, Ohta H, Takemori T. Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity*. 2001 Feb; 14(2):181-92.
- Talvani A, Rocha MO, Ribeiro AL, Borda E, Sterin-Borda L, Teixeira MM. Levels of anti-M2 and anti-beta1 autoantibodies do not correlate with the degree of heart dysfunction in Chagas' heart disease. *Microbes Infect*. 2006 Aug; 8(9-10):2459-64.
- Tangye SG, Avery DT, Deenick EK, Hodgkin PD. Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *J Immunol*. 2003b Jan 15; 170(2):686-94.
- Tangye SG, Avery DT, Hodgkin PD. A division-linked mechanism for the rapid generation of Ig-secreting cells from human memory B cells. *J Immunol*. 2003a Jan 1; 170(1):261-9.
- Tangye SG, Deenick EK, Palendira U, Ma CS. T cell-B cell interactions in primary immunodeficiencies. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Feb; 1250:1-13.
- Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol*. 2009 Aug; 39(8):2065-75.
- Tanowitz HB, Machado FS, Jelicks LA, Shirani J, de Carvalho AC, Spray DC, Factor SM, Kirchhoff LV, Weiss LM. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis*. 2009 May-Jun; 51(6):524-539.
- Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol*. 2007 Aug; 19(4):430-4.
- Taylor JJ, Jenkins MK, Pape KA. Heterogeneity in the differentiation and function of memory B cells. *Trends Immunol*. 2012 Dec; 33(12):590-7. doi: 10.1016/j.it.2012.07.005.
- Tendeiro R, Fernandes S, Foxall RB, Marcelino JM, Taveira N, Soares RS, Baptista AP, Cavaleiro R, Gomes P, Victorino RM, Sousa AE. Memory B-cell depletion is a feature of HIV-2 infection even in the absence of detectable viremia. *AIDS*. 2012 Aug 24; 26(13):1607-17.
- Tesselaar K, Xiao Y, Arens R, van Schijndel GM, Schuurhuis DH, Mebius RE, Borst J, van Lier RA. Expression of the murine CD27 ligand CD70 in vitro and in vivo. *J Immunol*. 2003 Jan 1; 170(1):33-40.
- Tosello Boari J, Amezcua Vesely MC, Bermejo DA, Ramello MC, Montes CL, Cejas H, Gruppi A, Acosta Rodríguez EV. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma*

- cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. PLoS Pathog. 2012; 8(4):e1002658.
- Tovar NC, Echeverry MC, Mora G. [Presence of antibodies to cardiac neuroreceptors in patients with Chagas disease]. Biomedica. 2009 Sep; 29(3):476-94.
- Tretter T, Venigalla RK, Eckstein V, Saffrich R, Sertel S, Ho AD, Lorenz HM. Induction of CD4+ T-cell anergy and apoptosis by activated human B cells. Blood. 2008 Dec 1; 112(12):4555-64.
- van Lier RA, Borst J, Vroom TM, Klein H, Van Mourik P, Zeijlemaker WP, Melief CJ. Tissue distribution and biochemical and functional properties of Tp55 (CD27), a novel T cell differentiation antigen. J Immunol. 1987 Sep 1; 139(5):1589-96.8
- van Oers MH, Pals ST, Evers LM, van der Schoot CE, Koopman G, Bonfrer JM, Hintzen RQ, von dem Borne AE, van Lier RA. Expression and release of CD27 in human B-cell malignancies. Blood. 1993 Dec 1; 82(11):3430-6.
- Van Overtvelt L, Vanderheyde N, Verhasselt V, Ismaili J, De Vos L, Goldman M, Willems F, Vray B. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. Infect Immun. 1999 Aug; 67(8):4033-40.
- van Zelm MC. Human CD27+IgM+IgD+ B cells: T-cell or TLR-dependent? Blood. 2012 Dec 13; 120(25):4905-6
- Vaskova M, Fronkova E, Starkova J, Kalina T, Mejstrikova E, Hrusak O. CD44 and CD27 delineate B-precursor stages with different recombination status and with an uneven distribution in nonmalignant and malignant hematopoiesis. Tissue Antigens. 2008 Jan; 71(1):57-66.
- Vattuone NH, Szarfman A, Gonzalez Cappa SM. Antibody response and immunoglobulin levels in humans with acute or chronic *Trypanosoma cruzi* infections (Chagas' disease). J Trop Med Hyg. 1973 Feb; 76(2):45-7.
- Vicco MH, Ferini F, Rodeles L, Cardona P, Bontempi I, Lioi S, Beloscar J, Nara T, Marcipar I, Bottasso OA. Assessment of cross-reactive host-pathogen antibodies in patients with different stages of chronic Chagas disease. Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2013 Oct; 66(10):791-6.
- Villani FN, Rocha MO, Nunes Mdo C, Antonelli LR, Magalhães LM, dos Santos JS, Gollob KJ, Dutra WO. *Trypanosoma cruzi*-induced activation of functionally distinct $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ CD4- CD8- T cells in individuals with polar forms of Chagas' disease. Infect Immun. 2010 Oct; 78(10):4421-30. doi: 10.1128/IAI.00179-10.
- Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. Am Heart J. 1994. 127:151-62.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. Ann Intern Med. 2006 May 16; 144(10):724-734.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, Lage PS, Elói-Santos SM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. Scand J Immunol. 2005 Sep; 62(3):297-308.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, Borges JD, Lage PS, Lana M, Teixeira-Carvalho A, Dias JC, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing

- activated CD8⁺ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol.* 2006 Jul; 145(1):81-92.
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Pinto Dias JC, Gontijo ED, Faria AM, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol.* 2008 Nov; 68(5):516-25.
- Wei C, Anolik J, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard A, Brooks J, Lee EH, Milner EC, Sanz I. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2007 May 15; 178(10):6624-33.
- Weller S, Bonnet M, Delagreverie H, Israel L, Chrabieh M, Maródi L, Rodriguez-Gallego C, Garty BZ, Roifman C, Issekutz AC, Zitnik SE, Hoarau C, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Rodrigo C, Arkwright PD, Cerutti A, Meffre E, Zhang SY, Alcais A, Puel A, Casanova JL, Picard C, Weill JC, Reynaud CA. IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B cells are markedly reduced in IRAK-4⁻, MyD88⁻, and TIRAP⁻ but not UNC-93B-deficient patients. *Blood.* 2012 Dec 13; 120(25):4992-5001.
- Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O, Tchernia G, Steiniger B, Staudt LM, Casanova JL, Reynaud CA, Weill JC. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood.* 2004 Dec 1; 104(12):3647-54.
- Weller S, Faili A, Garcia C, Braun MC, Le Deist F F, de Saint Basile G G, Hermine O, Fischer A, Reynaud CA, Weill JC. CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 30; 98(3):1166-70.
- Widney D, Gundapp G, Said JW, van der Meijden M, Bonavida B, Demidem A, Trevisan C, Taylor J, Detels R, Martínez-Maza O. Aberrant expression of CD27 and soluble CD27 (sCD27) in HIV infection and in AIDS-associated lymphoma. *Clin Immunol.* 1999 Nov; 93(2):114-23.
- Wirhth S, Lanzavecchia A. ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells. *Eur J Immunol.* 2005 Dec; 35(12):3433-41.
- Wu YC, Kipling D, Dunn-Walters DK. The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front Immunol.* 2011 Dec 26; 2:81.
- Yamamoto M, Takeda K. Current views of toll-like receptor signaling pathways. *Gastroenterol Res Pract.* 2010; 2010:240365.
- Yang ZZ, Grote DM, Xiu B, Ziesmer SC, Price-Troska TL, Hodge LS, Yates DM, Novak AJ, Ansell SM. TGF- β upregulates CD70 expression and induces exhaustion of effector memory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia.* 2014 Feb 26
- Yuseff MI, Pierobon P, Reversat A, Lennon-Duménil AM. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat Rev Immunol.* 2013 Jul; 13(7):475-86.
- Zabel F, Kündig TM, Bachmann MF. Virus-induced humoral immunity: on how B cell responses are initiated. *Curr Opin Virol.* 2013 Jun; 3(3):357-62.
- Zhang L, Tarleton RL. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp Parasitol.* 1996 Nov; 84(2):203-13.
- Zhu Y, Yao S, Chen L. Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model. *Immunity.* 2011 Apr 22; 34(4):466-78.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012 Mar; 12(2):240-53.

Zuñiga E, Motran CC, Montes CL, Yagita H, Gruppi A. *Trypanosoma cruzi* infection selectively renders parasite-specific IgG+ B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide. *J Immunol.* 2002 Apr 15; 168(8):3965-73.

ABREVIATURAS

8.ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APC	Célula presentadora de antígeno profesional
BCR	Receptor de linfocito B
CD	Clúster de diferenciación
CDC	Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
CDR	Regiones determinantes complementarias
CG	Centro germinal
CSR	Recombinación del isotipo de inmunoglobulina
CTL-4	Proteína asociada a linfocitos T citotóxicos-4
CVID	Inmunodeficiencia común variable
DS	Desvío standard
DTU	Unidades de Tipificación Discretas
ECG	Electrocardiograma
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Enzimático
ELISPOT	Ensayo por Inmunoabsorción Enzimático en Membrana
Fc	Fracción constante de la inmunoglobulina
HAI	Hemaglutinación Indirecta
HLA	Antígeno leucocitario humano
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN-γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IgV	Fracción variable de la inmunoglobulina
IL	Interleuquina
INP	Instituto Nacional de Parasitología
ITAM	Inmunoreceptor con motivos de activación basados en tirosina
ITIM	Inmunoreceptor con motivos de inhibición basados en tirosina
kDa	Kilo Daltons
LIT	Infusión de Hígado y Triptosa
Lyn	Tirosina quinasa de la familia de Src
MDR-TB	Tuberculosis multi-resistente a drogas
MFI	Intensidad de fluorescencia media
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MO	Médula ósea
MZ	Zona marginal
NK	Células natural killer
NO	Óxido nítrico
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMC	Células Mononucleares de sangre periféricas
PBS	Fosfato Buffer Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PHA	Polihidroxialcanoatos
PIRB	Receptor B del tipo inmunoglobulina que reconoce la porción Fc de la IgG
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RA	Artritis reumatoidea
Rx	Radiografía de tórax
SFB	Suero fetal bovino
SHM	Hipermutación somática
SLE	Lupus eritomatoso sistémico

Syk	Tirosina quinasa del bazo
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TCR	Receptor de linfocito T
Tfh	Células T colaboradora folicular
TGF	Factor de crecimiento transformante
Th	Célula T colaboradora
TLR	Receptor del tipo toll
TNF	Factor de Necrosis Tumoral.
XLP	Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X

ANEXO

9. ANEXO

9.1. Producción científica

Disturbances of the peripheral B lymphocyte compartment in human chronic Chagas disease

Fernández ER, Olivera GC, González MN, Hernandez-Vazquez Y, Sirena N, Morán L, Ledesma O and Postan M.

LVI Reunión Científica Annual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). 16-19 Noviembre, 2011, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Revista Medicina, Volumen 71.

The hallmark of chronic Chagas disease is the development of cardiac abnormalities in approximately 30% of individuals infected with *Trypanosoma cruzi*. In previous studies we have shown that chronic *T. cruzi* infection is associated with abnormalities of CD8⁺ and CD4⁺ T cell compartments, probably as a consequence of chronic antigenic stimulation by persisting parasites. In this study, we measured the levels of circulating naïve and memory B cells in chronic Chagas disease patients by flow cytometry. Twenty-one patients chronically infected with *T. cruzi* (mean age \pm SD= 40.35 \pm 13.5 yrs) living in endemic areas with active transmission (SE, n=8) and non-endemic areas (BA, n=13), were compared with 14 non-infected controls (mean age \pm SD= 34.31 \pm 10.2 yrs; SE n=8 and BA n=6). The results showed that *T. cruzi*-infected patients had higher percentages of naïve (CD19⁺CD27⁻IgD⁺; mean % \pm SD= 51,8 \pm 15,73) and lower percentages of memory (CD19⁺CD27⁺; mean % \pm SD= 36,96 \pm 17,44) B lymphocytes compared to controls (mean % \pm SD= 29,22 \pm 13,67 and 60,78 \pm 14,22 respectively, $p < 0.0002$), regardless the area of residence. As disease became more severe, a positive trend in the percentages of naïve ($P = 0.004$) and a negative trend in the percentages of memory ($P = 0.008$) B cells was found. Furthermore, a reduced proportion of switched memory B cells (CD19⁺CD27⁺IgD⁻; mean % \pm SD=26,52 \pm 14,44), associated to T cell-dependent immune responses was observed in patients from SE, and a reduced proportion of no-switched memory B cells (CD19⁺CD27⁺IgD⁺; mean % \pm SD=22,21 \pm 15,09), involved in T cell-independent responses, was observed in patients from BA, compared with their

respective controls (mean % \pm SD=46,76 \pm 11,59 and 40,83 \pm 18,95 respectively, $p < 0.05$). The accumulation of naïve and loss of discrete memory B cell subsets in chronic Chagas disease patients indicate that *T. cruzi* infection modulates the phenotypic profile of the peripheral blood B cell-compartment. Grant Support: FONCyT PICT 2007 N°1732.

Abnormal distribution of peripheral B lymphocyte subpopulations in chronic human *Trypanosoma cruzi* infection (43.7 P349).

Miriam Postan, Esteban Fernández, Mariela González, Yolanda Hernández Vásquez, Natalia Sirena, Maria Moran, Oscar Ledesma and Gabriela Olivera

The American Association of Immunologists Annual Meeting. Mayo 4-8, 2012, Boston, MA, EEUU. J Immunol 2012 188:43.7

In previous studies we have shown that human chronic *T. cruzi* infection is associated with abnormalities of CD8⁺ and CD4⁺ T cell compartments, probably as a consequence of chronic antigenic stimulation by persisting parasites. In this study, we measured the levels of circulating B cell subsets in 25 patients chronically infected with *T. cruzi* and 19 non-infected controls (mean age \pm SD=41.0 \pm 12.2 and 34.9 \pm 10.6 y respectively). The results showed that *T. cruzi*-infected patients had higher percentages of CD19⁺CD27-IgD⁺ (naïve; mean% \pm SD=54.1 \pm 16.1) and lower percentages of CD19⁺CD27⁺ (Ag-experienced; mean% \pm SD=35.8 \pm 16.5) B lymphocytes compared to controls (mean% \pm SD=33.8 \pm 15.8 and 55.7 \pm 18.0, respectively, $p < 0.05$), with similar levels of CD69 or CD86 activation markers. The observed memory B cell reduction comprised switched (IgD⁻) and no-switched (IgD⁺) subsets (mean% \pm SD=17.9 \pm 11.2 and 17.9 \pm 12.6, respectively) in relation to controls (mean% \pm SD=30.9 \pm 17.8 and 24.8 \pm 16.4, respectively; $p < 0.05$). The proportion of CD19⁺CD27⁺CD138⁺ plasma cells in patients was lower than in the controls (mean% \pm SD=5.0 \pm 3.6 and 26.4 \pm 27.1 respectively; $p < 0.05$), with no differences in CD19⁺CD10⁺ cell levels (immature; mean% \pm SD=5.6 \pm 4.7 and 4.3 \pm 3.3, respectively). The accumulation of naïve and loss of memory B cell and plasma cell subsets in chronic Chagas disease patients indicate that *T. cruzi* infection affects the phenotypic profile of the peripheral blood B cell-compartment. Support: FONCyT PICT 2007 N°173

Chronic infection with *trypanosoma cruzi* alters the phenotypic profile of circulating memory B cells in humans (MPF2P.812)

Miriam Postan, Luz Quebrada Palacio, Yolanda Hernández-Vásquez and Esteban Fernández

The American Association of Immunologists Annual Meeting. Mayo 2-6, 2014, Pittsburg, PA, EEUU. J Immunol 2014 192:67.11

Trypanosoma cruzi was shown to induce the loss of parasite-specific IgG-producing B cells during the acute infection of mice, which was proposed to hamper B cell responses and favor parasite replication and chronicity (Zuñiga et al. 2002). Herein, we measured the levels of circulating memory and MZ-like B cells in 12 individuals chronically infected with *T. cruzi* and 9 healthy controls based on the expression of CD19, IgM IgD, IgG, and CD27. *T. cruzi*-infected individuals had significantly lower percentages of IgM+IgD-CD27+ (IgM-only), IgM-IgD-CD27+ (isotype-switched) and IgG+IgD-CD27+ memory B cells compared to controls ($p<0.05$). Also, the percentage of IgM+IgD+CD27+ (MZ-like) B cells was reduced in infected individuals while the proportion of IgG+IgD-CD27- memory B cells was increased ($p<0.05$). The levels of memory B cells were further analyzed according to ECG findings in infected individuals (asymptomatic [ASY] and chronic Chagas heart disease [CHD]). IgG+IgD-CD27+, IgM+IgD-CD27+ and IgM-IgD-CD27+ B cells were significantly reduced in the ASY group compared to controls ($p<0.05$); CHD individuals had decreased levels of IgM-IgD-CD27+ and IgM+IgD-CD27+ B cells ($p<0.05$). Altogether, our data indicate that chronic exposure to *T. cruzi* modulates the phenotypic profile of the peripheral blood CD19+ B cell compartment in humans, and that some of the defects develop early in the infection, prior the onset of heart symptoms. Supported by Argentinian MINCYT/FONCYT PICT 2010-2148

Altered Distribution of Peripheral Blood Memory B Cells in Humans Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*.

Fernández ER, Olivera GC, Quebrada Palacio LP, González MN, Hernandez-Vasquez Y, Sirena NM, Morán ML, Ledesma Patiño OS, Postan M.

PLoSOne. 2014 Aug 11; 9(8) :e104951. doi:10.1371/journal.pone.0104951. PMCID: 4128741.

Numerous abnormalities of the peripheral blood T cell compartment have been reported in human chronic *Trypanosoma cruzi* infection and related to prolonged antigenic stimulation by persisting parasites. Herein, we measured circulating lymphocytes of various phenotypes based on the differential expression of CD19, CD4, CD27, CD10, IgD, IgM, IgG and CD138 in a total of 48 *T. cruzi*-infected individuals and 24 healthy controls. Infected individuals had decreased frequencies of CD19+CD27+ cells, which positively correlated with the frequencies of CD4+CD27+ cells. The contraction of CD19+CD27+ cells was comprised of IgG+IgD-, IgM+IgD- and isotype switched IgM-IgD- memory B cells, CD19+CD10+CD27+ B cell precursors and terminally differentiated CD19+CD27+CD138+ plasma cells. Conversely, infected individuals had increased proportions of CD19+IgG+CD27-IgD- memory and CD19+IgM+CD27-IgD+ transitional/naïve B cells. These observations prompted us to assess soluble CD27, a molecule generated by the cleavage of membrane-bound CD27 and used to monitor systemic immune activation. Elevated levels of serum soluble CD27 were observed in infected individuals with Chagas cardiomyopathy, indicating its potentiality as an immunological marker for disease progression in endemic areas. In conclusion, our results demonstrate that chronic *T. cruzi* infection alters the distribution of various peripheral blood B cell subsets, probably related to the CD4+ T cell deregulation process provoked by the parasite in humans.