



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica



Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular
"Dr. Héctor N. Torres"

IDENTIFICACIÓN DE EPITOPES DE *Trypanosoma cruzi* MEDIANTE ANÁLISIS *IN VITRO* DE LA RESPUESTA CELULAR EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Lic. Gonzalo R. Acevedo

Directora: Dra. Karina A. Gómez

Parte de los resultados expuestos en este trabajo de Tesis, en particular en el capítulo **4. Expansión y detección *ex vivo* de linfocitos T de memoria específicos contra *T. cruzi* de pacientes con enfermedad de Chagas crónica**, fueron publicados en la revista PLoS ONE el 26 de mayo de 2017, bajo el título **“Methodological approach to the *ex vivo* expansion and detection of *T. cruzi* -specific T cells from chronic Chagas disease patients”** (Acevedo, Gonzalo R; Longhi, Silvia A; Bunying, Alcinette; Sabri, Nazila; Zago, P; Santos, Radleigh; Judkowski, Valeria A; Atienza, Augusto; doi: 10.1371/journal.pone.0178380).

El trabajo **“Descubrimiento guiado por bioinformática de nuevos epitopes de *Trypanosoma cruzi* reconocidos por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de pacientes con enfermedad de Chagas crónica”**, elaborado a partir de resultados mostrados en el capítulo **5. Aproximación bioinformática al descubrimiento de epitopes de *T. cruzi* reconocidos por linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica**, fue galardonado con el Premio Leonardo Satz al mejor trabajo en Inmunología de la Sociedad Argentina de Inmunología, durante la Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias, en Noviembre de 2017.

Agradecimientos

El desarrollo de este trabajo de Tesis contó con el aporte indispensable de muchísimas personas, sin cuyo apoyo no hubiera sido posible. Dedico estas palabras a quienes contribuyeron, a sabiendas de ello o no, a mi formación científica y humana durante los años de arduo trabajo que aquí se plasman. Es por eso que quiero agradecer:

- A la Dra. Karina Gómez, quien supervisó y guió este proceso con un espíritu trabajador incansable y con paciencia y cariño maternales. La vocación es algo que viene de adentro de uno, pero también es algo que se transmite. Estoy infinitamente agradecido y feliz por los obstáculos atravesados y los éxitos celebrados como equipo.
- A nuestros colaboradores imprescindibles, los Dres. Clemencia “Chacha” Pinilla, Valeria Judkowski y Morten Nielsen, por aportar recursos, tiempo y puntos de vista que enriquecieron infinitamente este trabajo e inspiraron mi curiosidad científica. También, y en especial, a la Dra. Silvia Longhi por su contribución fundamental a los resultados que forman parte de esta Tesis, y por la revisión crítica de última hora.
- A los médicos, Dres. Marisa Fernández, Yolanda Hernández, Raúl Chadi, Augusto Atienza, Hugo Garro, y sus respectivos colaboradores, que sacrificaron tiempo y esfuerzo para, sumado a su tarea elemental en el cuidado de los pacientes con enfermedad de Chagas, participar del desarrollo de este trabajo.

- A los pacientes, por el gesto altruista de donar sangre para permitir nuestra investigación.
- A Alexandra Elbakyan, por *remover barreras en el camino de la ciencia* y permitirnos el acceso al conocimiento bibliográfico.
- A mis compañeros de equipo y el resto de la comunidad de Laboratorio 222 y aledaños (actuales y antiguos), por compartir y multiplicar las alegrías, y por tolerar y diluir los disgustos a los que todo científico se somete a diario. No puedo imaginarme un lugar de trabajo en el que hubiera podido estar mejor durante estos casi 5 años. Extiendo el agradecimiento a la siempre solidaria y generosa comunidad del INGEBI, en especial a nuestros compañeros de cuarto de cultivo y referentes de confianza en temas de parasitología del Laboratorio 209.
- A la Dra. Susana Laucella y su equipo, especialmente la Lic. Melisa Castro, por enseñarme los trucos y trampas de la técnica de ELISPOT y permitirme desinteresadamente el uso del analizador. También, a los grupos de los Dres. Schilaci, Rabinovich y Zwirner por el acceso a equipamiento y la transferencia de *know-how*. En especial, a la Dra. Andrea Ziblat por instruirme en el fino arte de la marcación intracitoplasmática de citoquinas.

Desde un punto de vista diferente, pero igualmente importante, quiero decir gracias a quienes fueron mi soporte personal en este camino, y la inspiración constante de mi deseo de superación:

- A mis papás, mi cimiento firme y constante, por ser mi refugio, mi aliento y mi consuelo, y a mis hermanos, por ser mis aliados incondicionales y el viento en mis velas.
- A Martín, por el compañerismo y el apoyo cotidianos, el amor de todos los colores, y por todo lo demás.
- Al resto de mi familia, con quienes celebramos los éxitos y desahogamos las tristezas.
- A mis amigos, los de acá, los de allá y los de acullá. Muy especialmente, a los que estuvieron cerquita en esta etapa y

compartieron euforias y angustias, me levantaron cuando caí y me impulsaron para seguir.

Índice

Índice	i
Resumen.....	v
1. Introducción.	1
1.1. Enfermedad de Chagas.	1
1.1.1. Contexto epidemiológico y social.....	1
1.1.2. Ciclo de vida e infección de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.2. Interacciones entre <i>T. cruzi</i> y el sistema inmune en la infección.....	7
1.2.1. <i>T. cruzi</i> y la respuesta inmune innata.....	8
1.2.1.1. Sistema del complemento.	8
1.2.1.2. Macrófagos y neutrófilos: invasión, escape y modulación de la función. 12	
1.2.1.3. Células dendríticas: <i>T. cruzi</i> y el nexo entre las respuestas innata y adaptativa.	15
1.2.1.4. <i>T. cruzi</i> es blanco de los linfocitos asesinos naturales (NK).....	17
1.2.2. <i>T. cruzi</i> y la respuesta inmune adaptativa	21
1.2.2.1. Linfocitos B: secreción de anticuerpos y función inmunomoduladora....	21
1.2.2.2. Linfocitos T: eliminación, colaboración, regulación.	26
Linfocitos T citotóxicos y eliminación de formas intracelulares de <i>T. cruzi</i>	31
Linfocitos T colaboradores y modulación de la respuesta inmune específica ..	38
2. Hipótesis y objetivos.	46

3. Materiales y métodos.....	48
3.1. Soluciones y medios de cultivo.....	48
PBS/PBS-Tw.....	48
Solución de Carbonato de Sodio.....	48
Solución de bloqueo de ELISA.....	48
Medios RPMI-SFB/RPMI-SFB3/ RPMI-SH.....	48
Medio LIT.....	49
Medio de separación inmunomagnética.....	49
Solución de lisis de epimastigotes.....	49
Solución de lisis de tripomastigotes.....	49
3.2. Selección de pacientes y toma de muestras.....	49
3.3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.....	50
3.4. Lisado de parásitos.....	50
3.4.1. Epimastigotes.....	50
3.4.2. Tripomastigotes/amastigotes.....	51
3.5. Citometría de flujo.....	51
3.5.1. Anticuerpos y equipamiento.....	51
3.5.2. Marcación de moléculas de superficie.....	52
3.5.3. Marcación intracitoplasmática de citoquinas.....	52
3.6. Generación de líneas de linfocitos B inmortalizados.....	53
3.7. Estimulación y cultivo de linfocitos T.....	54
3.7.1. Estimulación inicial de CMN y mantenimiento de cultivos de linfocitos T... 54	
3.7.2. Expansión con PHA.....	55
3.7.3. Separación de linfocitos T CD4 ⁺ de memoria.....	55
3.7.4. Estimulación inicial de linfocitos T CD4 ⁺ de memoria.....	56
3.7.5. Ensayo de evaluación de la especificidad de cultivos de linfocitos T.....	57
3.7.6. Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivo.....	57
3.7.7. Medición de proliferación por incorporación de [³ H-metil]-Timidina.....	58
3.7.8. Aislamiento de poblaciones clonales por ensayo de dilución límite.....	58

3.7.9. Perfil de expresión de TCR-V β	59
3.8. Predicción de epítopes T de <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
3.8.1. Bases de datos y secuencias.....	59
3.8.2. Software y selección de péptidos candidatos.....	60
3.9. Ensayo de ELISPOT.....	61
3.9.1. Sustracción magnética de poblaciones celulares.....	62
3.10. Análisis estadístico.....	63
4. Expansión y detección <i>ex vivo</i> de linfocitos T de memoria específicos contra <i>T. cruzi</i> de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.....	64
4.1. Optimización del protocolo de estimulación y cultivo de linfocitos T a partir de células mononucleares de sangre periférica.....	64
4.1.1. Efecto de la duración del estímulo inicial en la expansión de linfocitos T específicos contra <i>T. cruzi</i>	65
4.1.2. Efecto de las expansiones con PHA en la selección de linfocitos T específicos.....	71
4.1.3. Utilización de linfocitos B inmortalizados como células presentadoras de antígenos de <i>T. cruzi</i> a linfocitos T en cultivo.....	74
4.2. Generación de líneas celulares de linfocitos T específicos contra <i>T. cruzi</i> a partir de linfocitos T CD4 ⁺ de memoria.....	76
4.2.1. Efecto del estímulo inicial en la expansión de linfocitos T específicos contra <i>T. cruzi</i> a partir de linfocitos T CD4 ⁺ de memoria.....	76
4.2.2. Generación de líneas policlonales de linfocitos T CD4 ⁺ de memoria específicos contra <i>T. cruzi</i>	81
4.2.3. Generación de líneas monoclonales de linfocitos T CD4 ⁺ de memoria específicos contra <i>T. cruzi</i>	83
4.3. Discusión.....	86
4.3.1. Relevancia de la metodología desarrollada.....	86
4.3.2. Importancia de la población de partida y el estímulo inicial para la generación de líneas de linfocitos T patógeno-específicas.....	86
4.3.3. Efecto de las estimulaciones con PHA sobre los cultivos de linfocitos T patógeno-específicos.....	88

4.3.4. Parámetros de detección de cultivos específicos.	89
4.3.5. Utilización de linfocitos B autólogos inmortalizados como células presentadoras de antígenos.....	90
4.3.6. Generación de líneas clonales de linfocitos T CD4 ⁺ de memoria específicas contra <i>T. cruzi</i>	90
4.3.7. Perspectivas.....	90
5. Aproximación bioinformática al descubrimiento de epitopes de <i>T. cruzi</i> reconocidos por linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.	93
5.1. Resultados.....	93
5.1.1. Predicción bioinformática de epitopes T de <i>Trypanosoma cruzi</i>	93
5.1.2. Evaluación de la inmunogenicidad <i>in vitro</i> de los epitopes predichos	96
5.1.2.1. Fase exploratoria: evaluación de mezclas de péptidos.....	96
5.1.2.2. Fase de deconvolución: evaluación de péptidos individuales.....	98
5.1.3. Caracterización de los epitopes validados.....	100
5.1.3.1. Cobertura poblacional de la respuesta.....	100
5.1.3.2. Inmuno-relevancia de los epitopes descritos.....	101
5.1.3.3. Perfil de la respuesta específica contra los péptidos.	102
5.1.3.4. Predicción de unión de los péptidos a moléculas de CMH expresadas por pacientes.....	104
5.2. Discusión.....	111
5.2.1. Utilidad de la aproximación predictiva por redes neuronales al descubrimiento de epitopes T de <i>T. cruzi</i>	111
5.2.2. Propiedades de la respuesta observada frente a los péptidos predichos.....	112
5.2.3. Perspectivas.....	114
6. Conclusión.....	116
7. Bibliografía.....	119

Resumen

La respuesta inmune celular, y en particular la mediada por linfocitos T, juega un rol fundamental en el control de la infección por *Trypanosoma cruzi*. En pacientes con infección crónica ha demostrado estar relacionada con la progresión desde el estadio asintomático a la cardiopatía chagásica. No obstante, la complejidad del parásito y de su interacción con el sistema inmune del hospedero dificultan la identificación y caracterización de epitopes activadores de linfocitos T. En este contexto, el estudio de la respuesta frente a la infección por *T. cruzi* es de interés estratégico, y en particular, el uso de métodos novedosos para el análisis de respuesta inmune celular desarrollada por el paciente en la fase crónica de la enfermedad de Chagas podría aportar elementos de valor para el desarrollo de vacunas profilácticas y/o terapéuticas, y el diseño de tratamientos de inmunointervención.

El objetivo general de este trabajo de Tesis fue el estudio de la respuesta inmune de memoria mediada por linfocitos T generada frente a la infección por *T. cruzi* en humanos, y se abordó mediante dos estrategias complementarias.

La primera implicó el desarrollo de un protocolo para la expansión *ex vivo* de linfocitos T de memoria específicos contra el parásito, a partir de la estimulación *in vitro* de células de sangre periférica de pacientes con enfermedad de Chagas crónica, con y sin sintomatología cardíaca. La respuesta específica de los cultivos se midió como proliferación celular y secreción de IFN- γ y GM-CSF. En primera instancia, se logró determinar que cuando la población de partida son células mononucleares totales, la duración de la

estimulación inicial con lisado del parásito tiene una relación directa con la expansión (en nuestro caso, indeseada) de linfocitos T vírgenes activados *in vitro*, que no tienen relación con la respuesta inmune generada *in vivo*. Partiendo de linfocitos T CD4⁺ de memoria separados magnéticamente, se demostró que un estímulo inicial con lisado del parásito es ventajoso sobre uno con un mitógeno inespecífico, porque expande selectivamente las células patógeno-específicas, y genera así líneas policlonales con especificidad estable en el tiempo. Adicionalmente, se validó la utilización de linfocitos B autólogos inmortalizados como células presentadoras de antígenos de *T. cruzi* en ensayos de desafío *in vitro*. Los resultados destacaron la importancia de la utilización de múltiples métodos de detección para la selección de cultivos con respuesta específica. A partir de líneas policlonales generadas a partir de linfocitos T CD4⁺ de memoria de un paciente asintomático, se realizó un ensayo de dilución límite para generar líneas monoclonales *T. cruzi*-específicas, de utilidad inmediata en el estudio de la respuesta T en el contexto de la enfermedad de Chagas.

La segunda empleó una estrategia bioinformática de predicción de epitopes, acoplada a validación *in vitro* por ELISPOT para IFN- γ en muestras de CMN de pacientes con enfermedad de Chagas. Se identificaron 7 secuencias de *T. cruzi* que son o contienen epitopes T que activan linfocitos T de memoria. Experimentos con eliminación magnética de poblaciones celulares mostraron que esta respuesta involucra a las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺. Mientras que tres de los péptidos contienen epitopes ya descritos, los otros 4 contienen epitopes novedosos. Para uno de los pacientes se demostró que las células secretoras de IFN- γ frente a uno de los péptidos tienen un fenotipo predominantemente T_{CM}, que indica la renovación activa de esta población específica *in vivo*. No se encontró relación entre la respuesta frente a estos epitopes y la existencia de sintomatología cardíaca.

Los resultados presentados contribuyen al conocimiento sobre la respuesta anti-*T. cruzi* mediada por linfocitos T, en especial en cuanto a los linfocitos T colaboradores, un campo de investigación que, al día de hoy, se encuentra sub-explorado.

1. Introducción.

1.1. Enfermedad de Chagas.

1.1.1. Contexto epidemiológico y social.

La tripanosomiasis americana fue descrita por primera vez en 1909 por el científico brasileño Carlos Chagas, quien descubrió su agente causal, el parásito protozooario *Trypanosoma cruzi*, lo asoció a la transmisión por vectores hematófagos (*Triatoma spp.*, entre otros), comprobó su presencia en reservorios domésticos y peridomésticos, y describió el ciclo silvestre. El Dr. Chagas estudió asimismo las fases aguda y crónica de la enfermedad e inició la, aún inconclusa, explicación de la patogénesis de esta enfermedad (Coura y Borges-Pereira, 2010). En Argentina, el Dr. Salvador Mazza confirmó la existencia de casos autóctonos y diagnosticó por primera vez, en 1927, un caso agudo en el país (Ministerio de Salud de la Nación).

Más de un siglo después de su descubrimiento, la enfermedad de Chagas sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública en América del Sur y Central, con números aproximados de 6-7 millones de personas infectadas en el mundo, 100 millones en riesgo de infección, 56 mil nuevos casos por año y causando 12 mil fallecimientos anuales (Rodríguez Coura y Albajar Viñas, 2010; OMS, 2017a). Es la principal enfermedad parasitaria del hemisferio occidental, y su frontera socioeconómica es 7,5 veces mayor que la de la malaria¹ (Bern, 2015).

¹ Comparación establecida en función de DALY (Disability Adjusted Life Years, “años de vida ajustados por discapacidad”), utilizado por la OMS para cuantificar este parámetro en función de la mortalidad y la morbilidad de la enfermedad.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) la incluye en la lista de las 20 enfermedades tropicales desatendidas (*Neglected Tropical Diseases*). Esto implica que, junto con las otras infecciones clínicamente diversas, la enfermedad de Chagas está «fuertemente asociada con la pobreza, florece en ambientes empobrecidos y prospera especialmente en zonas tropicales, donde [las enfermedades de este grupo] tienden a coexistir». Los ambientes a los que los vectores se encuentran mejor adaptados y donde sobreviven y se multiplican suelen estar vinculados a condiciones de vivienda precaria, y esto constituye un nexo adicional entre enfermedad y pobreza. Asimismo, la OMS también señala que estas dolencias «han ocupado un lugar tradicionalmente relegado en las agendas de salud internacionales. Causan sufrimiento en masas, pero oculto y silencioso, y a menudo matan, pero no en números comparables a las muertes causadas por el VIH/SIDA, la tuberculosis y la malaria [...]. Como sólo son una amenaza en ambientes de pobreza, tienen baja visibilidad en el resto del mundo» (OMS, 2010).

La enfermedad de Chagas, como otras enfermedades desatendidas, tiene elevados costos económicos y constituye un obstáculo al desarrollo sustentable de sus países endémicos (OMS, 2017b). El costo de la atención médica de los pacientes es elevado. Por ejemplo, en 2008, la atención de pacientes con enfermedad de Chagas en el sistema de salud pública costó al estado colombiano aproximadamente US\$ 267 millones (OMS, 2017a). Debe además tenerse en cuenta el impacto directo de la patología sobre la actividad económica: se estima que representa una pérdida de productividad valuada en US\$ 12 mil millones por año en los 7 países más australes del continente americano (sólo en Brasil, se calcula una pérdida mínima de US\$ 5.6 millones por año debidas al ausentismo de trabajadores con la enfermedad), y unos 752 mil días-trabajo/día perdidos por muerte prematura (OMS, 2010).

Un componente adicional profundiza la fuerte asociación entre pobreza y enfermedad de Chagas: la estigmatización y segregación de los sectores poblacionales de bajos ingresos y de zonas rurales, especialmente en comunidades de pueblos originarios, afecta significativamente el acceso a los servicios de salud. Además, en entornos urbanos, se ha demostrado que la discriminación laboral (en términos de, por ejemplo, exclusión de la persona sólo por presentar serología positiva, independientemente de los síntomas) añade un nivel de complejidad adicional a la problemática. Este factor resulta en la reticencia de personas potencialmente infectadas a realizarse las pruebas

diagnósticas que son requeridas por la parte empleadora, y su consecuente inclinación hacia el trabajo informal. Esto a su tiempo redundaría en un deterioro de las condiciones de vida, retroalimentando el vínculo entre la enfermedad y la desventaja socioeconómica de sectores poblacionales concretos (Ventura-García et al., 2013).

No fue sino hasta hace poco tiempo que comenzó a prestarse debida atención a un factor, relativamente moderno, que afecta la distribución de la enfermedad de Chagas y expande sus fronteras (Schmunis y Yadon, 2010). A pesar de su carácter endémico, limitado originalmente por la ecología del vector, los fenómenos migratorios humanos desde áreas rurales hacia centros urbanos, y desde Latinoamérica hacia países no endémicos han generado nuevos desafíos para el control epidemiológico de la enfermedad (Rodríguez Coura y Albajar Viñas, 2010; Bern, 2015). El estancamiento económico y la represión política estimularon, a partir de las últimas dos décadas del s. XX, distintas olas migratorias desde los países latinoamericanos endémicos para enfermedad de Chagas hacia los países llamados del primer mundo, otorgándole carácter de problema de salud pública globalizado (Schmunis y Yadon, 2010). Se estima que la prevalencia de la infección en el conjunto de los migrantes latinoamericanos viviendo en Europa es de un 4,2%, mientras que en los EE. UU. se aproxima en 300 mil el número de inmigrantes portadores (Bern, 2015; Pérez-Molina y Molina, 2017). No obstante, y como factores agravantes, se cree que el índice de subdiagnóstico es de alrededor del 95%, y los profesionales de la salud en países no endémicos carecen de la experticia necesaria para proveer la atención adecuada a los enfermos (Stimpert y Montgomery, 2010; Pérez-Molina y Molina, 2017). También en el contexto de estos movimientos demográficos, la enfermedad de Chagas interactúa recíprocamente con factores socioeconómicos, tales como la formalidad laboral y el acceso a los sistemas de salud pública, para profundizar las desventajas de sectores sociales de por sí desfavorecidos (Rodríguez Coura y Albajar Viñas, 2010). En la **Figura 1** se resumen las vías de transmisión de la infección de relevancia epidemiológica.

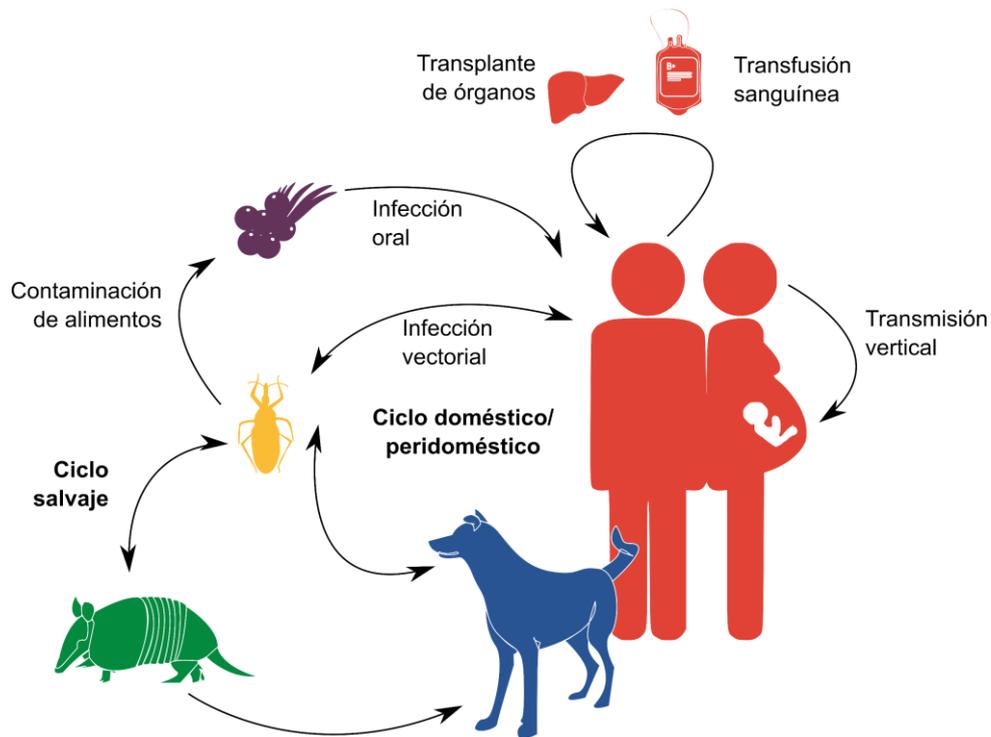


Figura 1

Vías más frecuentes de transmisión de *T. cruzi*. La existencia de un ciclo salvaje con reservorio en mamíferos silvestres imposibilita la erradicación total de la enfermedad. A pesar de que el control vectorial es fundamental para el control epidemiológico, existen vías independientes del vector que requieren otros mecanismos preventivos y complejizan el panorama de la enfermedad.

Por todo lo expuesto, puede decirse que la tripanosomiasis americana es una enfermedad de naturaleza infecciosa, pero fuertemente ligada a factores políticos, sociales y económicos, y cuyos efectos son principalmente padecidos por sectores marginados de la sociedad. Además, los fenómenos sociopolíticos de la actualidad han globalizado la enfermedad, generando nuevos desafíos para su control e incrementando la necesidad de generar herramientas para combatirla.

1.1.2. Ciclo de vida e infección de *Trypanosoma cruzi*.

Trypanosoma cruzi es un eucarionte unicelular (protozoario) y es de vida estrictamente parasitaria. Su ciclo de vida es complejo, y para completarse requiere de un vector insecto hematófago (en general, de la familia Reduviidae, principalmente de los géneros *Triatoma* y *Rhodnius*) y un hospedero mamífero. La **Figura 2** ilustra este ciclo a grandes rasgos.

Al alimentarse de un animal infectado, un insecto vector, ingiere junto con la sangre tripomastigotes (forma extracelular, no replicativa) circulantes y éstos llegan hasta el intestino medio. Allí se diferencian a la forma epimastigote, e inicia su replicación por mitosis. El siguiente paso en el ciclo implica cambios

que permiten que el parásito salga del ciclo replicativo y se desplace hacia el intestino posterior del insecto, para adherirse por interacción hidrofóbica a la cutícula de la pared del órgano e iniciar su diferenciación a la forma tripomastigote metacíclico, para luego desprenderse y ser excretado junto con las heces del insecto. La herida que genera el insecto al alimentarse puede contaminarse con estas heces, constituyendo el punto de entrada más frecuente de *T. cruzi* al hospedero mamífero. Otras posibles vías de ingreso son las mucosas del aparato digestivo tras la ingesta de alimentos contaminados o el contacto con la conjuntiva del ojo.

Los tripomastigotes metacíclicos son capaces de invadir una gran variedad de células nucleadas del organismo de un mamífero (Tyler y Engman, 2001). La interacción con la célula a invadir se inicia mediante un número de proteínas de membrana que funcionan como ligandos de componentes de la superficie del parásito. En particular, destacan varios miembros de la superfamilia gp85/trans-sialidasa (TS) (Weinkauff et al., 2011; Walker et al., 2014). Proteínas de este grupo, junto con una proteína denominada penetrina,

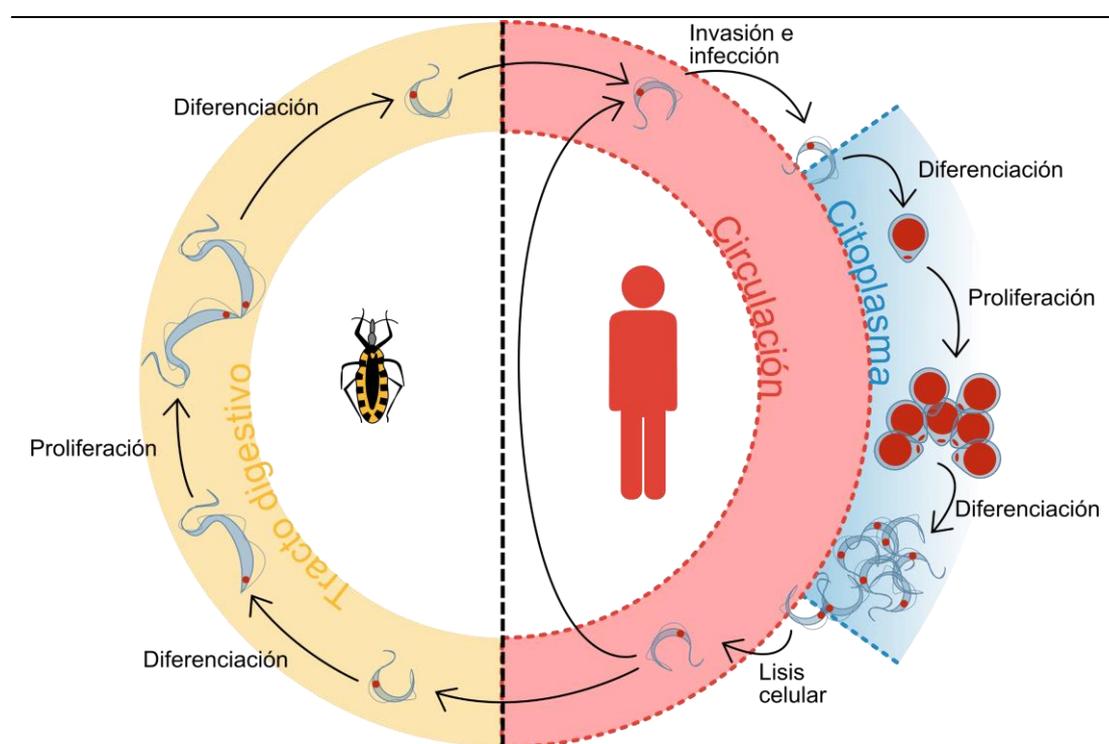


Figura 2

Ciclo de vida de *T. cruzi*. El parásito posee tres formas morfológicas claramente diferenciables al microscopio. La forma predominante en el vector es el epimastigote, que es móvil, de baja infectividad y replicativa. En el hospedero mamífero, coexisten dos formas: el tripomastigote (de altas infectividad y movilidad, no replicativo y de vida extracelular), y el amastigote (de bajas infectividad y movilidad, replicativo, de vida intracelular).

unen moléculas de la matriz extracelular y esto también tiene implicancias en el proceso de invasión. Por otra parte, también se conoce la capacidad de los tripomastigotes metacíclicos de invadir activamente e infectar el revestimiento de la mucosa estomacal y duodenal en el contexto de la infección oral (Walker et al., 2014). Un modelo alternativo de invasión, y que según algunos autores tendría mayor importancia cuantitativa, implica una vía independiente de lisosomas para el ingreso del parásito a la célula del hospedero, que depende en cambio de señalización por fosfatidilinositol 3-quinasas (PI3Ks). De todos modos, este modelo converge en un paso posterior con el anteriormente descrito, al unirse el parásito internalizado envuelto en membrana plasmática o endosomas tempranos con lisosomas, en un paso posterior (Burleigh, 2005; De Souza et al., 2010).

Una forma alternativa del parásito para iniciar la infección, y quizás la de mayor relevancia en la infección por piel o mucosas externas², es la infección de fagocitos, especialmente macrófagos. Al ser fagocitados, los parásitos quedan inicialmente retenidos en vacuolas parasitóforas, donde son eventualmente eliminados por el estrés oxidativo mediado por especies reactivas de nitrógeno (NO y peroxinitrito). Sin embargo, *T. cruzi* ha desarrollado, a lo largo de su evolución, mecanismos que permiten la detoxificación de estas especies (discutidos en mayor profundidad más adelante) y, a medida que la vacuola parasitófora madura para convertirse en fagolisosoma, escapar al citoplasma, poniéndose a resguardo de los radicales antimicrobianos (Walker et al., 2014). En este proceso aparecen también involucradas las TS: se sabe que su expresión en superficie y secreción por el parásito (que a su vez son mayores en aquellos que ya pasaron por un ciclo intracelular que en los tripomastigotes metacíclicos) permite el escape de la vacuola parasitófora, posiblemente interactuando con el ácido siálico del interior de la misma y facilitando la acción de la hemolisina de *T. cruzi* (TcTox), enzima encargada de desorganizar la membrana vacuolar (Rubin-de-Celis et al., 2006).

Una vez en el citoplasma, el tripomastigote se diferencia a amastigote, y prolifera formando cúmulos denominados pseudoquistes. Los pseudoquistes suelen crecer hasta ocupar prácticamente todo el volumen de la célula, y los amastigotes se diferencian nuevamente para convertirse en tripomastigotes

² Aunque hay controversia respecto de cuál es la vía predominante, se sabe que ambas, la invasión activa por parte de *T. cruzi* y la incorporación pasiva por el mecanismo de fagocitosis, están simultáneamente activas.

sanguíneos. Finalmente, al romperse la membrana de la célula infectada/pseudoquiste, los parásitos son liberados al medio extracelular, permitiendo la infección de nuevas células o el acceso al torrente sanguíneo, desde donde podrían potencialmente ser ingeridos por vectores hematófagos (Tyler y Engman, 2001; Rassi et al., 2010; Bern, 2015).

1.2. Interacciones entre *T. cruzi* y el sistema inmune en la infección.

Muchos patógenos que establecen infecciones crónicas, como es el caso de *T. cruzi*, se caracterizan por una propiedad común que es crucial para su supervivencia: la capacidad de evadir y/o modular los mecanismos del sistema inmune. Es altamente probable que esta característica haya sido adquirida a lo largo de la historia co-evolutiva del patógeno y los procesos inmunitarios de su hospedero. De esta manera, *T. cruzi* ha evolucionado maneras sofisticadas de escapar, inactivar o subvertir diferentes componentes del sistema inmune humano.

A pesar de que los diferentes actores de este sistema funcionan en una interdependencia estrecha, es útil subdividir su estudio para facilitar su comprensión. Así, se habla por un lado de inmunidad innata para referirse a los mecanismos celulares y bioquímicos que se encuentran activos incluso antes de ocurrir una infección, y que se caracterizan por responder, esencialmente, de la misma forma frente a exposiciones reiteradas a un mismo patógeno. Por otro lado, la inmunidad adaptativa se caracteriza por una respuesta que, idealmente, aumenta en magnitud y eficacia por la exposición reiterada a un mismo patógeno. Se define por dos características principales: una especificidad extremadamente fina por moléculas o partes de moléculas particulares y una capacidad de “recordar” tales moléculas o partes de moléculas para permitir una respuesta que aumenta su eficacia frente a la re-exposición (Abbas et al., 2012).

Los mecanismos funcionales de cada “tipo” de inmunidad están dados por sus componentes celulares y moleculares. En el caso de la inmunidad innata son:

- las barreras físicas y químicas de entrada al organismo (epitelios y moléculas antimicrobianas como las lisozimas de secreciones epiteliales);
- moléculas de la sangre, en particular los factores del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación;

- las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), las células dendríticas y los linfocitos asesinos naturales (linfocitos NK, por *Natural Killers*);
- y las citoquinas y quimioquinas, moléculas encargadas de señalar y coordinar mecanismos de la inmunidad innata.

En el caso de la inmunidad adaptativa:

- Linfocitos B y productos secretados por éstos al activarse, principalmente anticuerpos;
- Linfocitos T.

En función de estas distinciones, se revisan a continuación los diferentes fenómenos de interacción entre los componentes del sistema inmune y *T. cruzi*, frente a la entrada y persistencia en el organismo del parásito.

1.2.1. *T. cruzi* y la respuesta inmune innata.

1.2.1.1. Sistema del complemento.

El sistema del complemento consiste en un conjunto de proteínas que circulan en el plasma sanguíneo, y que actúan opsonizando patógenos, promoviendo el reclutamiento de células fagocíticas al sitio de infección y, en algunos casos, destruyendo de manera directa al patógeno. Su funcionamiento está dado por un mecanismo en cascada, en la cual un precursor enzimático (zimógeno) es activado, convirtiéndose en una proteasa activa capaz de segar el componente siguiente en la cascada, quien adquiere así actividad proteolítica y puede activar al siguiente factor. Se conocen hasta el momento tres vías por las cuales el primer paso de activación puede ocurrir, conocidas como las vías clásica, alternativa y de las lectinas. Todas ellas convergen en la formación de un complejo C3 convertasa (aunque la identidad del mismo varía entre la vía clásica y las otras dos), y la posterior separación de C3 en C3a y C3b. Todos los mecanismos efectores del complemento dependen de este paso: la fagocitosis promovida por complemento está mediada por receptores para C3b expresados por neutrófilos y macrófagos, y los péptidos producidos por proteólisis de C3 estimulan la inflamación. Además, C3b es requerido para la formación de C5 convertasa, que dará lugar a la generación de C5a, una molécula fuertemente pro-inflamatoria, y a la formación de poros en la membrana del patógeno.

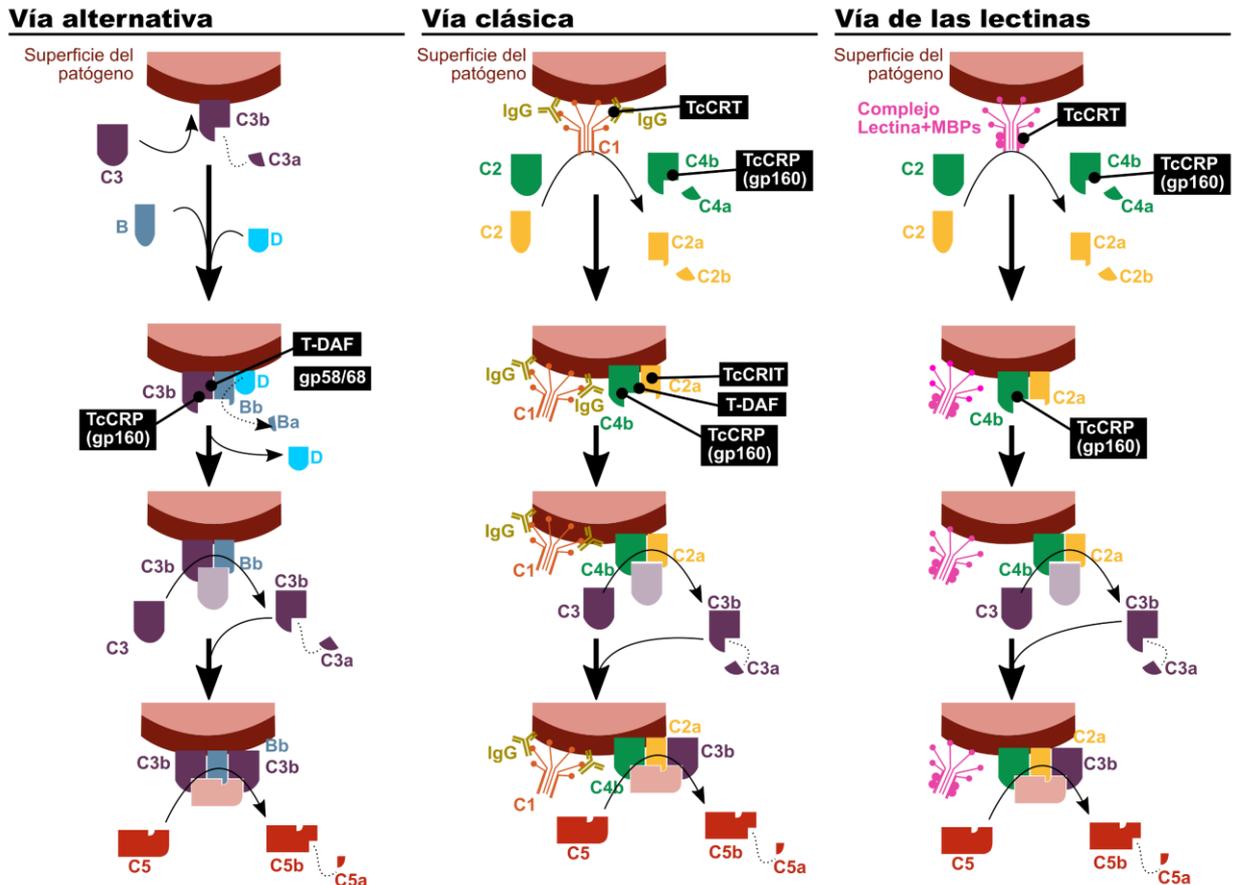
La vía clásica se activa cuando la proteína C1q (que circula como parte del complejo proteico C1, compuesto por C1q, C1r y C1s) detecta anticuerpos (IgG o IgM) adheridos a la superficie de un patógeno u otra estructura. La unión de C1q a la fracción constante de una inmunoglobulina activa a la serina-

proteasa C1r, que corta y activa a la serina-proteasa C1s. Los blancos de esta última son la proteína C4, que es escindida en C4a y C4b, y C2, que se separa en C2a y C2b. C4b y C2a forman un nuevo complejo, C4b2a, que constituye la C3 convertasa de la vía clásica. Algunas de las moléculas de C3b generadas por la actividad de este complejo se unen a la propia convertasa para dar el complejo ternario C4b2a3b, que funciona como la C5 convertasa de la vía clásica.

La regulación de la activación de la vía alternativa depende de mecanismos biofísicoquímicos, a su vez modulados por distintas moléculas regulatorias expresadas por las células del hospedero. Normalmente, C3 es continuamente cortada en circulación, en bajas proporciones, para producir C3b. Este fragmento puede unirse covalentemente a los grupos amino o hidroxilo de la superficie microbiana, por reacción de un enlace tioéster reactivo que se expone al hidrolizarse C3. Si esta unión no ocurre y C3b permanece en fase fluida, el enlace tioéster es rápidamente degradado y la proteína se inactiva, deteniendo la vía de activación. Si por el contrario C3b se une a la superficie de un patógeno, cambia conformacionalmente, habilitando la interacción con una proteína conocida como factor B. Ésta a su vez, al unirse a C3b, se vuelve susceptible al factor D, una serina-proteasa, liberando un fragmento Ba y generando un Bb, que se mantiene unido a C3b en el complejo C3bBb. Este constituye la C3 convertasa de la vía alternativa. La unión de un fragmento C3b al complejo C3bBb da origen a la C5 convertasa de la vía alternativa.

Finalmente, la activación de la vía de las lectinas depende de la unión de lectinas circulantes, tales como la lectina de unión a manosa (MBL) o las ficolinas, a los polisacáridos superficiales de los microorganismos patógenos. Estas lectinas se asocian a serina-proteasas asociadas a MBL (MASPs, por *MBL-Associated Serine Proteases*), tales como MASP1, MASP2 y MASP3, que son estructural y funcionalmente análogas a C1r y C1s. A partir de la formación de C3 convertasa a través de la generación de C4b2a, la vía de las lectinas prosigue de manera idéntica a la vía clásica.

T. cruzi posee una batería de moléculas que inactivan o atenúan los mecanismos de activación del sistema del complemento, en sus tres vías, y que se representan en el esquema de la **Figura 3**.

**Figura 3**

T. cruzi posee mecanismos inhibitorios del sistema de complemento. Se señalan en recuadros negros las proteínas del parásito involucradas en la modulación y escape de esta vía de defensa del sistema inmune innato. (Adaptado de Abbas, Lichtman y Pillay, 2012)

La calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT) se encuentra en el retículo endoplásmico del epimastigote, pero es trasladada a la superficie celular luego de la infección. Se ha demostrado que tiene capacidad de unión a distintos sensores de patrones moleculares, entre los que destacan C1q, MBP (Ferreira et al., 2004) y L-ficolina (Sosoniuk et al., 2014). De esta forma, afecta directamente el primer paso de la vía clásica y de las lectinas de activación del complemento. No obstante, se ha comprobado que ratones deficientes en MASP-2 ven comprometida parcialmente la activación de la vía de las lectinas, y que en consecuencia, a pesar de que se observó un pico de parasitemia más prolongado respecto de ratones no mutantes, no hubo diferencias en la susceptibilidad frente a la infección en este modelo experimental (Ribeiro et al., 2015).

El factor de aceleración del decaimiento de tripomastigote (T-DAF) es una proteína de la familia de las trans-sialidasas inactivas, análoga al factor de aceleración del decaimiento humano (DAF), que modula la descomposición fisiológica de las C3 convertasas de las vías clásica y alternativa. Para cumplir su función, ambos DAF interfieren en la formación de los complejos factor B-C3b (vía alternativa) y C4b2a (vía clásica) (Cardoso et al., 2016; Geiger et al., 2016; Lidani et al., 2017).

La proteína reguladora del complemento de *T. cruzi* (TcCRP), también conocida como gp160 (por glicoproteína de 160 kDa) es una proteína, también clasificada entre las trans-sialidasas inactivas, anclada por glicofosfatidilinositol (GPI) a la membrana de tripomastigotes. Posee capacidad de unión a C3b y C4b, tanto en fase soluble como unidas a sustrato, y se ha demostrado que interfiere en las vías clásica y alternativa (Norris et al., 1991). Además, aunque no se ha comprobado experimentalmente, su capacidad de unión a C4b sugiere que también podría afectar a la vía de las lectinas (Lidani et al., 2017). Normalmente, no se expresa en superficie de epimastigotes ni amastigotes intracelulares, pero su expresión exógena en epimastigotes los vuelve menos susceptibles a la lisis por complemento (Norris et al., 1991, 1997). Algunos autores han propuesto una correlación entre la expresión de TcCRP y el grado de virulencia de algunas cepas de *T. cruzi* (Henrique et al., 2016). Sin embargo, la evidencia en ese sentido es escasa y poco concluyente.

El inhibidor del receptor del factor C2 de complemento de tres pasos transmembrana de *T. cruzi* (TcCRIT, por *T. cruzi Complement C2 Receptor Inhibitor Trispanning*) es una proteína de membrana que, al igual que sus homólogos en *Schistosoma haematobium* (ShCRIT, primera molécula de este tipo descrita, previamente conocida como TOR por *Trispanning Orphan Receptor*) y *Homo sapiens* (hCRIT), posee un dominio extracelular ácido estructuralmente similar a la cadena β de C4, el sitio de unión con C2. De esta manera, compite por la unión entre estas moléculas inhibiendo la formación de la C3 convertasa de la vía clásica de activación del complemento (Lidani et al., 2017; Ramírez-Tolosa y Ferreira, 2017).

La glicoproteína 58/68 (gp58/68) funciona como análogo de moléculas endógenas reguladoras del complemento, al disminuir la formación de la C3 convertasa de la vía alternativa mediante la inhibición de la unión del factor B con C3b, cuando este se une a la superficie del parásito. También se ha

reportado su liberación al medio por tripomastigotes en cultivo, aunque se desconoce si este mecanismo tiene relevancia biológica (Lidani et al., 2017).

1.2.1.2. Macrófagos y neutrófilos: invasión, escape y modulación de la función.

Las células especializadas en la fagocitosis, fundamentalmente los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, son la primera línea de defensa frente a los agentes patógenos que atraviesan las barreras de los epitelios. Poseen dos capacidades generales que son cruciales para su funcionamiento: el reconocimiento, internalización y destrucción de microorganismos, y la secreción de citoquinas, que promueven la inflamación y potencian la activación de otras células en el sitio de infección (Abbas et al., 2012).

Los macrófagos y neutrófilos expresan receptores de membrana que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs) y a daño (PMADs), permitiendo la detección y fagocitosis de microorganismos. Posteriormente, el fagocito activa mecanismos de eliminación del patógeno internalizado, por fusión del fagosoma (la vesícula conteniendo al patógeno resultante de la fagocitosis) con múltiples lisosomas para formar el fagolisosoma. En esta vesícula tienen lugar al menos tres acciones con función microbicida: el “estallido respiratorio” (“*respiratory burst*”) que genera especies reactivas de oxígeno (ERO, agentes fuertemente oxidantes); la activación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que permite la generación de especies reactivas de nitrógeno, como por ejemplo radicales peroxinitrito; y la proteólisis mediada por enzimas del fagolisosoma, como por ejemplo la elastasa y la catepsina G (Abbas et al., 2012).

El mecanismo de ingreso de *T. cruzi* a los fagocitos profesionales ha sido un punto de controversia, puesto que se han encontrado resultados discordantes en cuanto a si se da por mecanismos completamente extrínsecos al parásito o si éste tiene participación activa en el proceso. Por un lado, se ha reportado que la internalización del parásito es inhibida al bloquear farmacológicamente la polimerización de actina del fagocito, mientras que otros autores observaron que aún en tales condiciones el parásito es capaz de ingresar en macrófagos, apoyando la hipótesis de la invasión activa. El consenso actual incluye ambas hipótesis, y asume que al menos dos mecanismos de internalización actúan en la infección: uno de tipo fagocítico, dependiente de actina, y otro a través de estructuras planares de la membrana celular del macrófago, similares a microdominios (Romano et al., 2012).

Se considera que los macrófagos residentes de tejidos son las primeras células del hospedero invadidas por *T. cruzi*. Aunque este tipo celular puede internalizar tanto tripomastigotes como epimastigotes, sólo los primeros logran escapar del fagolisosoma (Romano et al., 2012; Cardoso et al., 2016). Para detoxificar los agentes oxidantes que el macrófago activado produce para su eliminación (Romano et al., 2012; Dos-Santos et al., 2016), el parásito cuenta con una red metabólica antioxidante compuesta por varias enzimas y moléculas no enzimáticas distribuidas entre diversos compartimientos subcelulares. Entre ellas, se conocen cinco peroxidases o peroxirredoxinas: la triparredoxina peroxidasa citosólica (TcCPX) y mitocondrial (TcMPX), que detoxifican peroxinitrito, H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos de cadena corta, la hemoperoxidasa dependiente de ascorbato (TcAPX) del retículo endoplásmico, que confiere resistencia a H_2O_2 , y las glutatión peroxidasa I y II (TcGPXI, ubicada en el glicosoma³ y el citosol, y TcGPXII ubicada en el retículo endoplásmico), que permiten resistir a peróxidos lipídicos e hidroperóxidos (Cardoso et al., 2016). La actividad de estos factores se resume en la **Figura 4**. Adicionalmente, se ha demostrado en modelo murino que la enzima cruzipaína, una cisteína-proteasa del parásito, disminuye la actividad tripanocida de macrófagos mediante un aumento de la actividad arginasa (enzima que compete con la iNOS por su sustrato, la L-arginina) y disminución de la de la iNOS (Stempin et al., 2002). Cabe señalar que en pacientes pediátricos con enfermedad de Chagas, a pesar de observarse una disminución en el tamaño de la población de células tipo macrófago (en términos morfológicos), el análisis de moléculas de superficie demostró que la población de monocitos pro-inflamatorios de fenotipo $CD14^+CD16^+HLA-DR^{Hi}$ tiene una mayor frecuencia en esos pacientes, en comparación con niños de la misma edad pero sin la infección (Vitelli-Avelar et al., 2006)

La interacción de *T. cruzi* con los neutrófilos ha sido estudiada en modelos murinos de susceptibilidad (ratones BALB/c) y resistencia (ratones C57BL/6) a la infección por parásitos de la cepa Tulahuen. En el modelo susceptible, los animales experimentan aumento de parasitemia, cantidad de pseudoquistes en tejidos y mortalidad al sustraerse las poblaciones de monocitos y neutrófilos. En el modelo resistente, en cambio, la misma sustracción lleva a

³ El glicosoma es un tipo especial de peroxisoma, que evolucionó por divergencia para convertirse en una organela típica de los tripanosomátidos. En su interior, separado mediante una monocapa de membrana del resto del citoplasma, ocurre la glucólisis, parte de la β -oxidación de ácidos grasos y la detoxificación de algunos peróxidos.

disminución de la parasitemia, sin alterar la cantidad de pseudoquistes ni la mortalidad. El análisis comparativo del perfil de citoquinas secretadas en condiciones de eliminación de monocitos/neutrófilos sugiere un rol protector frente a la infección para la secreción de interleuquina (IL)-12, interferón (IFN)- γ y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α por parte de macrófagos, mientras que la secreción de IL-10 parece no verse afectada (Chen et al., 2001). Resultados de investigaciones posteriores apuntan a diferencias en la inducción, por parte de los neutrófilos sobre los macrófagos, de la producción de NO dependiente de TNF- α y de elastasa por un lado (mayor producción tendría efecto protector en C57BL/6), y de prostaglandina E2 y TGF- β por el otro (mayor producción conduciría a susceptibilidad, por aumento de la replicación del parásito, en BALB/c) (Luna-Gomes et al., 2014).

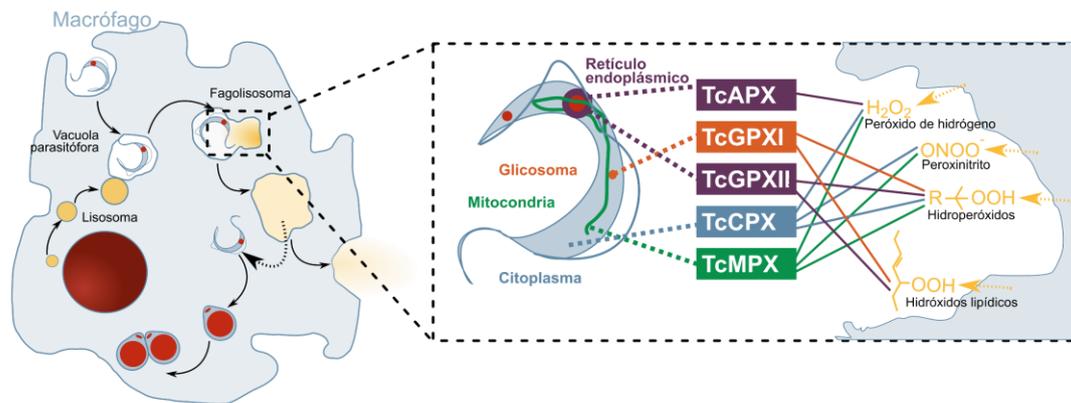


Figura 4

T. cruzi escapa a la acción microbicida de los macrófagos saliendo del fagolisosoma hacia el citoplasma y empleando enzimas que detoxifican especies oxidantes de oxígeno y nitrógeno. A la izquierda se ilustra el ingreso del parásito a la célula y su escape de la vía normal del fagolisosoma, previo a su diferenciación y replicación. A la derecha, se esquematizan las peroxidasas que permiten al parásito inactivar moléculas microbicidas generadas por el macrófago activado.

En humanos, se ha estudiado la expresión de metaloproteinasas (MMPs, enzimas involucradas en la remodelación de la matriz extracelular) y distintas citoquinas en neutrófilos y monocitos de pacientes con enfermedad de Chagas, con o sin sintomatología cardíaca, así como en individuos no infectados. En función de observaciones *in vitro*, se concluyó que estos tipos celulares estarían involucrados en coordinar la respuesta inmune adaptativa, regular la inflamación mediante la secreción de citoquinas y la remodelación de la matriz extracelular en corazón, lo cual podría relacionarse con la fibrosis asociada a la cardiopatía chagásica. En cuanto a este último punto, los autores sugieren que la

MMP-2 tendría una acción preventiva del daño tisular en corazón, en correlación con la secreción de IL-10 y TNF- α , mientras que la MMP-9 funcionaría como potenciador de la inflamación, perjudicando al tejido cardíaco (Medeiros et al., 2017).

Un mecanismo adicional a la fagocitosis y eliminación de patógenos propio de los neutrófilos en el contexto de la respuesta inmune innata es la formación de trampas extracelulares (NETs, por *Neutrophil Extracellular Traps*), estructuras fibrosas formadas por ADN, histonas, elastasa y proteínas granulares, que contribuyen a la eliminación de patógenos. Su rol microbicida ha sido estudiado principalmente en la neutralización de bacterias, pero su rol en la respuesta frente a otros tipos de patógenos no es claramente comprendido. En ese sentido, Sousa-Rocha *et al.* (2015) demostraron que tanto los tripomastigotes como los antígenos solubles de *T. cruzi* son capaces de inducir la liberación de NETs mediante la activación de receptores TLR-2 y -4, y que esta respuesta es dependiente de la activación del estallido respiratorio, pues requiere de la formación de EROs. Adicionalmente, se comprobó que no poseen actividad tripanocida, puesto que no afectan la viabilidad de los parásitos, pero logran disminuir su infectividad induciendo su diferenciación de tripomastigote a amastigote en el medio extracelular (Sousa-Rocha et al., 2015).

1.2.1.3. Células dendríticas: *T. cruzi* y el nexo entre las respuestas innata y adaptativa.

Al igual que los macrófagos y neutrófilos, las células dendríticas también se activan en presencia de PMAPs y PMADs. Se encuentran constitutivamente presentes en los epitelios y la mayoría de los tejidos del cuerpo, es decir, estratégicamente ubicadas para la detección del ingreso de patógenos. Además, expresan la mayor diversidad conocida de receptores de PMAPs y PMADs de todo el organismo humano, lo que las vuelve las células más versátiles a la hora de captar estos patrones moleculares. Su función más sobresaliente es la de iniciar y dirigir la respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T, que a su vez está estrechamente vinculada con su propio rol en la respuesta inmune innata: capturar antígenos proteicos, transportarlos a los nódulos linfáticos (donde se concentran los linfocitos T vírgenes) y presentar dichos antígenos en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), permitiendo su reconocimiento por parte de los linfocitos T. Gracias a esto, son consideradas el nexo entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. Una vez activada, una célula dendrítica responde expresando moléculas coestimuladoras y citoquinas

que son necesarias, además del propio antígeno, para la activación de los linfocitos T. El perfil de citoquinas producido dependerá de la naturaleza del patógeno activador y dirigirá la diferenciación de los linfocitos T vírgenes hacia diferentes perfiles funcionales (Abbas et al., 2012; Gil-Jaramillo et al., 2016).

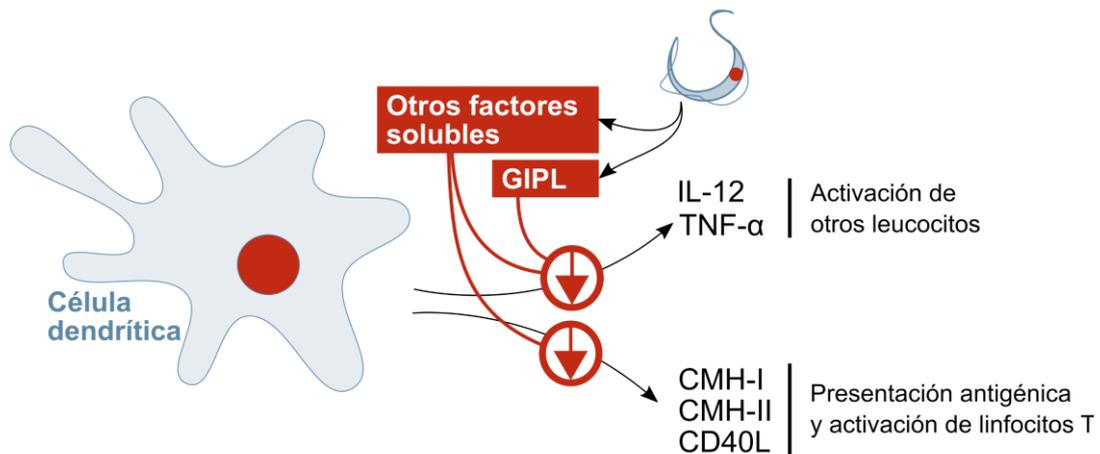


Figura 5

T. cruzi modula la actividad de las células dendríticas y afecta su capacidad de activar mecanismos de la respuesta inmune adaptativa. Los factores en recuadros rojos modifican la secreción de citoquinas según indican las flechas rojas encerradas en círculos.

En el contexto de la infección por *T. cruzi*, se ha demostrado que el parásito es internalizado en células dendríticas, aunque experimentos en modelo murino indican que hay diferentes niveles de infectividad que dependen de la cepa de parásito, y que esa dependencia no se condice con su clasificación filogenética en unidades discretas de tipificación (UDT⁴), ni con parámetros biológicos de las células dendríticas (Da Costa et al., 2014).

Experimentos con células dendríticas humanas han permitido observar que su función es afectada por el parásito mediante factores secretorios, induciendo un perfil tolerogénico mediante la disminución de la producción de IL-12 y de TNF- α (Van Overtvelt et al., 1999). Cabe mencionar que en este modelo experimental se observó invasión de citoplasma de estas células por parte del patógeno. También se observó un efecto mediado por factores solubles de *T. cruzi* sobre la capacidad de presentación antigénica de la célula dendrítica, que indujeron disminución en la expresión de moléculas de CMH de clases I y

⁴ Las UDT de *T. cruzi* son 6 unidades taxonómicas sub-específicas definidas por consenso para facilitar el estudio de la biología de este parásito, especialmente en tópicos de estructura poblacional, genética comparativa, biogeografía y eco-epidemiología (Zingales et al., 2012).

II, y del co-receptor CD40 (Van Overtvelt et al., 1999, 2002). Se ha logrado atribuir estos efectos, al menos parcialmente, a glicosilinositolfosfolípidos (GIPL) del parásito (Brodskyn et al., 2002). El compromiso en la función activadora de linfocitos T de las células dendríticas ocasionado por los fenómenos descritos se demostró al observarse una disminución en la secreción de IFN- γ por parte de linfocitos T en experimentos de presentación antigénica *in vitro*, en los que se utilizó células dendríticas pre-tratadas con el parásito como presentadoras antigénicas. Este efecto fue independiente de la especificidad de los linfocitos T (Van Overtvelt et al., 2002). Experimentos con células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón sugirieron que la activación del receptor inhibitorio SIGLEC-E por la unión de ligandos sialilados de la superficie del parásito, también forma parte de este mecanismo inmunomodulador, al disminuir la secreción de IL-12 y aumentar la de IL-10 (Erdmann et al., 2009). La acción inhibitoria de *T. cruzi* sobre las células dendríticas se esquematiza en la **Figura 5**.

1.2.1.4. *T. cruzi* es blanco de los linfocitos asesinos naturales (NK)

Los linfocitos asesinos naturales (o NK por *Natural Killer*) juegan un rol importante en la respuesta inmune innata, especialmente en infecciones por patógenos intracelulares. A diferencia de los linfocitos T y B, los NK no requieren expansión clonal y diferenciación para cumplir su función. Constituyen entre un 5% a un 15% de las células mononucleares en la sangre y el bazo, aunque presentan baja frecuencia en tejidos (salvo excepciones como el útero durante el embarazo y el hígado). Otra diferencia respecto de los demás linfocitos es que no expresan receptores antigénicos altamente diversos y de distribución clonal, sino que discriminan a las células infectadas o estresadas de las células sanas mediante receptores codificados en la línea germinal. La regulación de su función ocurre mediante el balance de señales activadoras e inhibitorias disparadas por estos receptores. Entre los principales inhibidores de la acción citotóxica de los linfocitos NK están las moléculas de CMH clase I, cuya expresión es común a todas las células nucleadas del organismo, en tanto estén en estado fisiológico normal (Abbas et al., 2012).

En cuanto a las funciones efectoras de los linfocitos NK, destacan, por un lado, la citotoxicidad, dirigida a la eliminación de células infectadas o dañadas, y por el otro, la modulación de funciones efectoras de otros tipos celulares del sistema inmune. Para la primera, los linfocitos NK (al igual que los linfocitos T citotóxicos, que se discutirán más adelante) cuentan con gránulos que son

excitados al producirse la activación, y que contienen proteínas como perforina y granzimas. La perforina permite a las granzimas atravesar la membrana de la célula blanco, y éstas a su vez desatan un conjunto de señales que inducen muerte celular por apoptosis. En cuanto a la segunda función, los linfocitos NK activados son potentes productores de IFN- γ , que activa a los macrófagos potenciando su actividad microbicida, y dirige la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia un perfil T_{H1} (ver Linfocitos T colaboradores y modulación de la respuesta inmune específica, más adelante). Ambas acciones de los linfocitos NK activados son positivamente reguladas por citoquinas del sistema inmune innato, fundamentalmente IL-12, IL-15, IL-18 y los interferones de tipo I (IFN- α e IFN- β), que estimulan la capacidad citotóxica y la producción de IFN- γ . Además, IL-12 e IL-15 son factores de crecimiento importantes para este tipo celular (Abbas et al., 2012).

En modelos murinos de infección por *T. cruzi* se ha demostrado el rol de los linfocitos NK en la inducción de sesgo hacia el perfil T_{H1} en linfocitos T y la activación de macrófagos mediante la secreción de IFN- γ . En el mismo modelo, se ha descubierto que los linfocitos NK producen un pico de secreción de IFN- γ poco tiempo después de la infección, en un proceso que es dependiente de células adherentes del timo, pero no de linfocitos T, y que además depende de la presencia de parásitos viables (en experimentos con parásitos inactivados por calor o radiación, la secreción de citoquina no se activó). Esta gran producción de IFN- γ sería fundamental para el control temprano de la parasitemia en fase aguda. Sustraer la población de linfocitos NK del ratón tiene como consecuencia la supresión de la secreción de IFN- γ y un aumento en la producción de IL-10, resultando probablemente en un perfil inmunitario más tolerogénico frente a la presencia del parásito (Cardillo et al., 1996). Adicionalmente, se ha comprobado que los linfocitos NK son capaces de eliminar parásitos en su forma extracelular libre, mediante la formación rápida de contactos intercelulares que resultan en la pérdida inmediata de movilidad del parásito y en daño a su membrana. Este mecanismo depende de la activación por IL-12 del linfocito NK e involucra la exocitosis de gránulos citotóxicos, pero es independiente de perforina (Lieke et al., 2004; Batalla et al., 2013). Esto ha llevado a sugerir que el rol de la población NK en el control de la frontera parasitaria, (es decir, la extensión en la que el parásito infecta los tejidos) tiene más que ver con la eliminación directa de los parásitos extracelulares que con el control de la forma intracelular replicativa. En la ilustración de la **Figura 6** se

representan algunas de las interacciones más importantes entre los linfocitos NK y *T. cruzi*.

La observación de una disminución de la capacidad infectiva del parásito sobre cultivos de fibroblastos de ratón en presencia de esplenocitos totales del mismo animal, que es revertida cuando se sustraen los linfocitos NK, ha sugerido un papel regulatorio de esta población celular en la respuesta frente a la infección por *T. cruzi* en células no inmunitarias. Al analizarse la naturaleza de esta interacción, se comprobó que está mediada por la secreción de IFN- γ por parte de los linfocitos NK, que induce un aumento en la expresión de iNOS en los fibroblastos. También se identificó a los interferones de clase I como mensajeros en la intercomunicación entre ambos tipos celulares, siendo producidos tanto por los fibroblastos como por los linfocitos NK en respuesta al parásito. No obstante, se demostró que el efecto de estos interferones, así como el de la IL-12, sobre el mecanismo tripanocida inducido por los NK en fibroblastos, es despreciable en este modelo experimental (Lieke et al., 2006).

Un factor adicional en la participación de los linfocitos NK en la respuesta inmune frente a la infección por *T. cruzi* tiene que ver con su papel en la maduración de las células dendríticas: en condiciones fisiológicas normales, los linfocitos NK activados dirigen la maduración de las células dendríticas mediante la secreción de citoquinas, a la vez que eliminan mediante su actividad citotóxica aquellas células dendríticas que no logran madurar correctamente. Experimentos en ratón han demostrado que la presencia de parásitos vivos, pero no así su lisado, afecta la citotoxicidad de los linfocitos NK sobre las células dendríticas inmaduras, y que esto genera un aumento en la parasitemia y una disminución en la supervivencia, pero sin afectar la frontera parasitaria (Batalla et al., 2013).

En cuanto a la función de las células NK en la enfermedad de Chagas humana, Ferreira *et al.* (2015) llevaron a cabo un estudio de transcriptómica de células de la sangre por el método de microarreglos de ADN complementario, en el que compararon los perfiles transcripcionales *ex vivo* de pacientes con enfermedad de Chagas crónica clasificados en diferentes grupos: con cardiopatía severa, con cardiopatía moderada, asintomáticos con PCR para ADN de *T. cruzi* positiva, asintomáticos con PCR negativa, y sujetos control sin infección con *T. cruzi*. A pesar de que la designación de estos grupos es cuestionable, puesto que utiliza distintos conjuntos de criterios para definir las

categorías de las muestras, vale mencionar que se encontraron diferencialmente expresados genes relacionados con la actividad de los linfocitos NK en pacientes asintomáticos con PCR negativa y con cardiopatía moderada (aumento), y en pacientes con cardiopatía severa (disminución) (Ferreira et al., 2015).

Un estudio fenotípico de las poblaciones circulantes en sangre de pacientes pediátricos y adultos, con enfermedad de Chagas asintomática o con cardiopatía, apuntó a un rol de los linfocitos pre-NK en la activación de mecanismos en macrófagos, durante estadios tempranos de la fase asintomática. Estos linfocitos pre-NK se caracterizan por ser predominantemente secretoras de citoquinas, a distinción de los NK maduros que son principalmente citotóxicos. También se observó una mayor frecuencia de linfocitos NK maduros en pacientes asintomáticos en comparación con pacientes cardiopatas, sugiriendo una contribución de este tipo celular al establecimiento y/o mantención de la ausencia de sintomatología durante la infección crónica (Vitelli-Avelar et al., 2006). Adicionalmente, experimentos de infección experimental de sangre periférica y sangre de cordón umbilical destacaron a los linfocitos NK como los productores más potentes de IFN- γ en respuesta a la exposición al parásito e IL-15 (Guilmot et al., 2014), sugiriendo una función de importancia en la respuesta primaria a la infección.

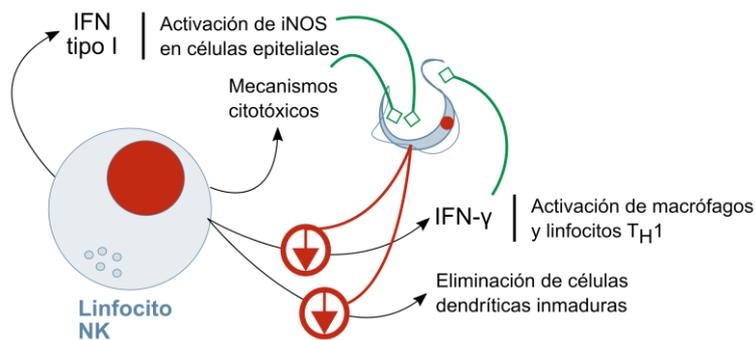


Figura 6

T. cruzi es blanco de los linfocitos NK, pero también posee mecanismos que afectan mecanismos secundarios activados por estas células. Se ilustran en verde los factores que se consideran beneficiosos y en rojo los que se consideran perjudiciales para el hospedero. Las flechas rojas encerradas en círculos muestran los mecanismos celulares afectados negativamente por el parásito.

1.2.2. *T. cruzi* y la respuesta inmune adaptativa

1.2.2.1. Linfocitos B: secreción de anticuerpos y función inmunomoduladora.

Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos. En los mamíferos, se generan y maduran a partir de precursores en la médula ósea, aunque es en los tejidos linfoides secundarios donde quedan expuestos a la interacción con antígenos foráneos. La respuesta adaptativa humoral se inicia por el reconocimiento de antígenos por parte de linfocitos B específicos. Para iniciar una respuesta de anticuerpos frente a un antígeno, este debe ser capturado y transportado a las zonas de linfocitos B de los órganos linfoides, donde en conjunto con otras señales generadas principalmente por la respuesta inmune innata, se inicia el proceso de activación del linfocito B. Al unirse el antígeno a inmunoglobulinas (Ig) de clase IgM o IgD en la membrana del linfocito B virgen, desata procesos de señalización que dirigen la activación de esta célula antígeno-específica y su diferenciación hacia linfocitos B de memoria y células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Abbas et al., 2012).

Se sabe que la infección por *T. cruzi* genera efectos sobre la maduración y diferenciación de los linfocitos B, que conducen a una respuesta por anticuerpos que no logra eliminar efectivamente al parásito ni conferir protección frente a la re-exposición (Acosta Rodriguez et al., 2007). Se ha descrito que los pacientes con enfermedad de Chagas crónica evidencian una mayor frecuencia de linfocitos B (CD19⁺) con expresión aumentada de moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 que individuos no infectados (Fares et al., 2013). Esta es una característica propia de los linfocitos B activados, y podría atribuirse a la presencia permanente antígenos activadores de estas células o a un fenómeno de activación crónica patológica.

Se ha observado en pacientes un aumento de la frecuencia de linfocitos B que comenzaría en la etapa aguda tardía, pero se hace significativo solo al principio de la etapa crónica (Sathler-Avelar et al., 2003). Sin embargo, se ha postulado que, en pacientes con enfermedad de Chagas en etapa crónica ya establecida, el número de linfocitos CD19⁺ no varía en sangre periférica, en comparación con muestras de individuos no infectados (Fares et al., 2013; Fernández et al., 2014), sugiriendo una contracción subsiguiente de esta población. A pesar de no alterarse el número total de linfocitos B circulantes, si se modificaría su composición subpoblacional: Fernández *et al.* (2014) reportaron una disminución selectiva de los linfocitos B de memoria

(CD19⁺CD27⁺IgD⁻) con distintos grados de diferenciación (tanto IgM⁺ como IgG⁺), así como de células plasmáticas terminalmente diferenciadas (CD19⁺CD27⁺CD138⁺), y un aumento de los poco convencionales linfocitos B doble negativos (DN, CD19⁺CD27⁻IgD⁻IgG⁺). Esto implica, según los autores, un aumento de linfocitos B incapaces de generar una respuesta sustancial de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*. Por otra parte, Fares *et al.* (2013) encontraron incrementada la subpoblación de linfocitos B que expresa CD21, un co-receptor asociado a CD19 que potencia la señal de activación generada a partir de las Ig de membrana en contacto con antígenos marcados por complemento y de respuesta dependiente de linfocitos T (Cherukuri *et al.*, 2001).

Desde los inicios de la investigación en inmunología de la enfermedad de Chagas, se ha estudiado la especificidad de los anticuerpos generados frente a la infección. Al momento de la redacción de este trabajo, la base de datos de inmunoepitopes (IEDB, <http://www.iedb.org>) tiene registros de 88 moléculas de *T. cruzi* que contienen en total más de 2×10^3 epitopes con anticuerpos específicos en infección humana y modelos de infección animal. De algunos de estos anticuerpos se dice a menudo que son “líticos”, es decir, que permiten la lisis del parásito mediada por el sistema del complemento. Entre los antígenos blanco de estos anticuerpos encontramos la gp190, el T-DAF, la proteína de superficie de 90 kDa y algunas glicoproteínas similares a mucinas ancladas por GPI. Se cree que el mecanismo por el que estos anticuerpos permiten la lisis directa del parásito tienen que ver con el bloqueo de las vías de evasión del complemento discutidas anteriormente (Krautz *et al.*, 2000). Entre otras proteínas reconocidas por anticuerpos, no necesariamente líticos, producidos en respuesta a *T. cruzi* encontramos a las mucinas (TcMUC), proteínas de superficie asociadas a mucinas (MASPs), trans-sialidasas, la proteína de superficie de amastigotes (ASP), la proteína del bastón paraflagelar TcPRP, la proteína relacionada a movilidad TcKMP-11, la glicoproteína gp82, la enzima neuraminidasa, la proteína de respuesta al *shock* térmico hsp70, proteínas ribosomales y otras (IEDB, accedida en Octubre de 2017), además de carbohidratos como el denominado “epitope *gal*” (*gal* α 1-3 *gal*) (Almeida *et al.*, 1991). Vale mencionar que la aplicación reciente de tecnologías de alto caudal de información (“*high throughput*”), así como de métodos de predicción informática, han expandido las posibilidades de explorar el repertorio de anticuerpos producidos frente a la infección por este parásito complejo, y se presentan como herramientas prometedoras para el estudio de la respuesta

adaptativa humoral en la enfermedad de Chagas (de Oliveira Mendes et al., 2013; Carmona et al., 2015).

La importancia de la respuesta de anticuerpos anti-*T. cruzi* para el control de la infección ha sido comprobada en modelo de infección en ratón, al evidenciarse que aunque animales mutantes incapaces de producir anticuerpos ($b2m^{-/-}$) viven considerablemente más que sus pares deficientes en linfocitos T, no logran controlar el crecimiento parasítico y sucumben durante la fase aguda de la infección (Kumar y Tarleton, 1998). Esto sugiere que una respuesta a linfocitos T, y no B, es crucial para el control inicial de la infección, pero los linfocitos B tendrían un rol clave en la supervivencia a largo plazo.

No obstante, los anticuerpos producidos no logran eliminar efectivamente al parásito, posiblemente debido a dos factores principales. El primero es la variabilidad antigénica del parásito, que expone en superficie una variedad de antígenos tales como mucinas, trans-sialidasas y MASPs, codificadas por familias multigénicas altamente polimórficas. Esta alta diversidad de moléculas expresadas al mismo tiempo retrasa la activación de clones específicos de linfocitos B, y de esta forma la producción y maduración de anticuerpos de alta afinidad con capacidad neutralizante (Pitcovsky et al., 2002; Buscaglia et al., 2006; Cardoso et al., 2016).

El segundo factor es la activación policlonal inespecífica de linfocitos B: observaciones en modelos murinos de infección aguda han permitido identificar moléculas del parásito que causan activación inespecífica, T independiente de linfocitos B, generando esplenomegalia debida a la proliferación de estas células e hipergamaglobulinemia asociada a la producción de anticuerpos sin especificidad por epitopes de *T. cruzi* (Ortiz-ortiz et al., 1980; Minoprio et al., 1988; Bermejo et al., 2011; Cardoso et al., 2016). Este fenómeno se ha asociado a la susceptibilidad frente a la infección en ratones BALB/c en contraste con la resistencia en ratones C57BL/6. Monitoreándose la producción de IgM e IgG total y anti-*T. cruzi* (evaluada como los anticuerpos específicos contra TcCRP), se comprobó que mientras que los primeros no producen IgM en respuesta al parásito, padecen hipergamaglobulinemia y respuesta específica contra el parásito disminuida, los segundos presentan un incremento inicial de IgG e IgM total seguidos por aumento en el título de anticuerpos anti-CRP de ambos isotipos (Bryan et al., 2010). Un caso de infección accidental permitió observar este fenómeno en el contexto del cuadro agudo en humanos, evidenciándose una

expansión de anticuerpos totales en plasma, inicialmente IgM e IgA, luego IgG. La especificidad de estos anticuerpos no estaba relacionada a antígenos de *T. cruzi* (Grauert et al., 1993). Entre las proteínas del parásito identificadas como mitógenos policlonales de linfocitos B, se encontraron la glutamato deshidrogenasa (TcGDH) (Montes et al., 2006), la prolina racemasa (Reina-San-Martín et al., 2000) y la TcTS (Gao et al., 2002).

En este punto, cabe destacar que una de las hipótesis más difundidas para explicar la patogénesis de la enfermedad de Chagas es la existencia de mecanismos autoinmunes desarrollados como consecuencia de la infección (Bonney y Engman, 2015). En particular, se ha encontrado evidencia de mimetismo⁵ entre motivos moleculares de proteínas del hospedero y antígenos del parásito, y se ha sugerido que esto podría dar lugar a la producción de autoanticuerpos con efectos deletéreos. En particular, se ha descrito este fenómeno entre la cadena pesada de miosina y el péptido B13, las proteínas ribosomales y receptores muscarínicos y adrenérgicos, y la proteína FL-160 y una proteína neuronal de 47 kDa, entre otros (Gironès et al., 2005; Gómez et al., 2006; Labovsky et al., 2007).

Además de su función secretora de anticuerpos, los linfocitos B cumplen un papel inmunomodulador de importancia para el establecimiento de la respuesta linfocitaria T y la determinación de su perfil. Ambas poblaciones interactúan entre sí en el contexto de la activación frente a un patógeno, modulando mutuamente sus mecanismos efectores (Abbas et al., 2012). En ese sentido, se observó que ratones deficientes en linfocitos B ($\mu\text{MT}^{-/-}$) tienen un mayor pico de parasitemia, pero similar mortalidad que los ratones no mutantes durante la infección aguda, sugiriendo que esta población no juega un rol crucial para el control de la infección durante esta etapa. Sin embargo, en el curso de la infección se evidenció una menor secreción de IFN- γ e IL-12 por parte de los esplenocitos de los ratones mutantes, y una disminución de estas citoquinas asociada a un aumento de IL-18 en el suero de estos animales. Adicionalmente, se comprobó una expansión deficiente de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, sugiriendo que los linfocitos B son de importancia crucial para el establecimiento de las poblaciones de linfocitos T de memoria (Cardillo et al., 2007), que a su vez, como se discutirá en mayor profundidad más adelante, son

⁵ Se entiende por mimetismo molecular a la existencia de estructuras similares compartidas por moléculas de genes disímiles, incluso a pesar de tener secuencias y/u orígenes evolutivos muy diferentes (Oldstone, 2005).

imprescindibles para el control de la infección. Experimentos en un modelo murino de vacunación con un péptido de TcTS confirmaron estas observaciones, señalando además que aunque los linfocitos B son imprescindibles para la respuesta adaptativa sistémica generada por esta vacuna, no serían necesarios para la inmunidad inducida en mucosas (aunque observada en el bazo) a partir de la misma (Sullivan et al., 2015).

Un fenómeno inesperado descrito por primera vez en el modelo murino de infección por *T. cruzi* fue la observación de linfocitos B productores de IL-17⁶, que contribuyen de manera mayoritaria a la secreción de esta citoquina (incluso superando ampliamente a los linfocitos T_H17, que son generalmente considerados como los principales productores de IL-17 y que se describen más adelante). Llamativamente, esta respuesta parece activarse por la modificación enzimática de trans-sialidasas sobre la proteína CD45 del linfocito B, y depende de una vía de señalización y un programa transcripcional diferentes de los que dirigen la activación de los linfocitos T_H17 (Bermejo et al., 2013). En humanos, la secreción de IL-17 fue comprobada en co-cultivos de éstas células, obtenidas de explantes de amígdalas de sujetos no infectados, con tripomastigotes. El agregado de anticuerpos anti-TcTS logró bloquear la activación de esta vía (Bermejo et al., 2013). Estos resultados ponen en relieve el rol de los linfocitos B en la modulación de la respuesta celular y la definición de su perfil.

Finalmente, se ha descrito una subpoblación de linfocitos B con función inmunosupresora, implicada en favorecer la tolerancia inmune. En condiciones fisiológicas normales, estos linfocitos B regulatorios (B_{reg}) secretan IL-10, IL-35 y TGF- β , y suprimen las patologías autoinmunes impidiendo la expansión de clones patogénicos de linfocitos T y otros linfocitos pro-inflamatorios (Rosser y Mauri, 2015). Fares *et al.* (2013) describieron que los pacientes con enfermedad de Chagas crónica tienen una mayor frecuencia de linfocitos B productores de IL-10 y TGF- β en sangre periférica, tanto en estado basal como frente a estimulación *in vitro* con lisado del parásito. A su vez, los autores describen que la mayoría de los linfocitos B secretores de IL-10 tendrían un fenotipo CD1d⁺CD5⁺. Resta esclarecer si, en el contexto de la enfermedad de Chagas crónica, estas células tienen un efecto benéfico, al contener una respuesta

⁶ Como se discutirá más adelante, la IL-17 es una citoquina que afecta fundamentalmente a las células de la inmunidad innata, y contribuye al reclutamiento y activación de granulocitos/neutrófilos, entre otras funciones.

inflamatoria desmedida, o perjudicial, al propiciar la tolerización frente a la presencia del parásito.

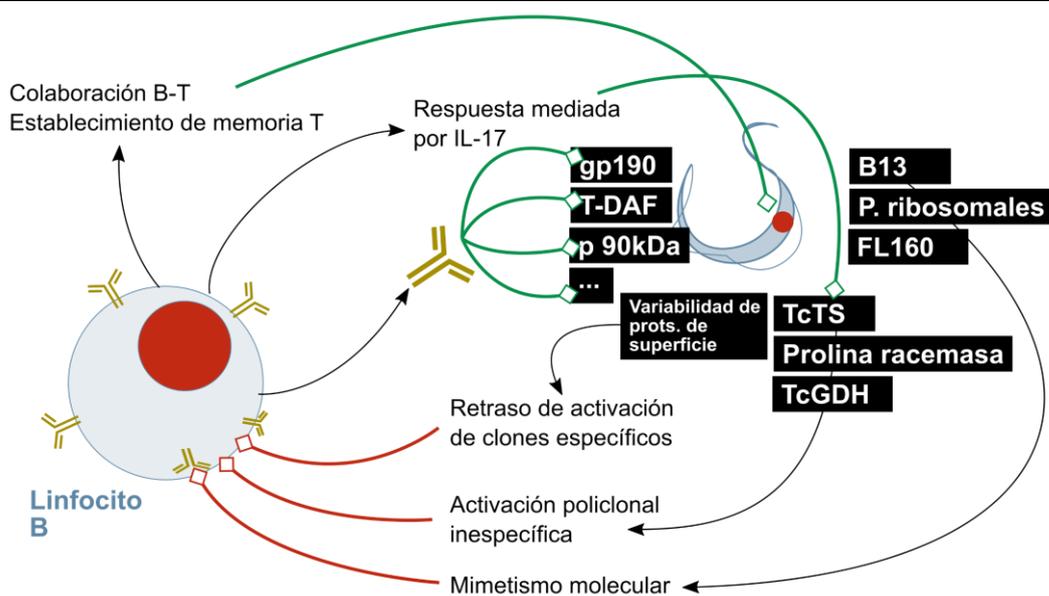


Figura 7

La respuesta mediada por linfocitos B es central para el control de la infección por *T. cruzi*, pero también es blanco de mecanismos del parásito que favorecen su escape y se asocian a la patogénesis. Se ilustran en verde los factores que se consideran beneficiosos y en rojo los que se consideran perjudiciales para el hospedero.

En la **Figura 7** se representan algunos de los factores más importantes en la activación de la respuesta mediada por linfocitos B y las características del parásito que comprometen la efectividad de esa respuesta.

1.2.2.2. Linfocitos T: eliminación, colaboración, regulación.

La respuesta de linfocitos T se inicia (generalmente) por señales producidas por el reconocimiento de complejos péptido-CMH en la superficie de las células presentadoras de antígenos, mediante el receptor de célula T (RCT). La finalidad de esta activación es generar, a partir de un conjunto relativamente pequeño de linfocitos T vírgenes (*naïve*), que poseen RCTs con especificidades diversas generadas mediante recombinación aleatoria de segmentos génicos, un gran número de linfocitos T efectores funcionales patógeno-específicos. La activación de un linfocito T virgen desencadena su expansión clonal y cambios en la expresión de moléculas, especialmente de receptores de membrana, que le otorgan capacidad efectora (Abbas et al., 2012).

En el contexto de una infección aguda, se suele hablar de tres fases de la respuesta de linfocitos T: (i) iniciación (*priming*) y expansión, (ii) resolución y contracción y (iii) memoria (Laidlaw et al., 2016).

Durante la primera fase, los linfocitos T se dividen y diferencian a linfocitos T efectoras, aumentando la expresión de CD69 (que aumenta su retención en tejidos linfoides), CD25 (receptor de IL-2, IL-2R α ; esta citoquina es un potente factor de crecimiento para los linfocitos T), CD154 (ligando de CD40, CD40L, permite la maduración de las funciones colaboradoras de los linfocitos T para con los macrófagos y los linfocitos B), CD152 (CTLA-4, modulador inhibitorio de la respuesta). Simultáneamente, se incrementa la producción de otras moléculas de adhesión y receptores de quimioquinas que favorecen la migración hacia y retención en órganos linfoides, tales como L-selectina y el receptor de quimioquinas de motivo C-C 7, (CCR7, Appay *et al.*, 2008; Abbas *et al.*, 2012). Este direccionamiento de los linfocitos favorece el encuentro con células presentadoras en los ganglios y otros tejidos linfáticos. Un cambio de utilidad particular para el estudio de la biología de los linfocitos T es el balance de expresión de isoformas de *splicing* de la molécula CD45. Esto permite diferenciar entre las subpoblaciones de memoria, que expresan preferencialmente CD45RO (o CD45R0), y las *naïve*, que expresan preferencialmente CD45RA (Mahnke et al., 2013) [aunque en este último caso, es importante tener en cuenta la co-expresión de CCR7 para poder distinguir entre linfocitos T *naïve* (CD45RA⁺CCR7⁺) y terminalmente diferenciados o tardíos (CD45RA⁺CCR7⁻) (Appay et al., 2008)]. En su conjunto, estos cambios tienen la función de, amplificar rápidamente la respuesta específica, la generación de poblaciones efectoras y de memoria, la potenciación de la función presentadora de las CPA y limitar la respuesta a niveles no patológicos.

En el marco de la enfermedad de Chagas crónica, se ha observado que los pacientes tanto asintomáticos como con cardiopatía poseen una frecuencia aumentada de linfocitos T activados circulantes, y que estas células secretan citoquinas pro- y anti-inflamatorias (Dutra y Gollob, 2008), lo cual puede interpretarse como un signo de respuesta en curso frente a la infección crónica, y de una regulación activa de la misma. La respuesta a linfocitos T es particularmente importante para el mantenimiento de la baja parasitemia típica de la fase crónica (Sartori et al., 2002), y una deficiencia en la misma, tal y como puede observarse en los casos de co-infección con VIH, lleva a la

aparición relativamente rápida de sintomatología acorde a un cuadro de cardiopatía chagásica (Vaidian et al., 2004; dos Santos Virgilio et al., 2014).

Los linfocitos T efectores llevan a cabo funciones destinadas a eliminar patógenos invasores y que, en estados patológicos, pueden producir inflamación y daño tisular. Mientras que los linfocitos T vírgenes son activados principalmente en los tejidos linfoides, los efectores pueden hacerlo en cualquier tejido. Frente a la activación, aumentan la expresión de moléculas involucradas en la migración hacia sitios de infección o lesión tisular (como las integrinas LFA-1 y VLA-4, las E- y P-selectinas y varios receptores de quimioquinas), donde encuentran el antígeno para el cual son específicos e inician mecanismos destinados a la eliminación de la fuente de ese antígeno (Appay et al., 2008; Abbas et al., 2012). Por un lado, las distintas subpoblaciones de linfocitos efectores $CD4^+$, conocidos como linfocitos T colaboradores o T_H (por *T helper*), potencian los mecanismos de eliminación de patógenos fagocitados en macrófagos, reclutan otras células, estimulan la inflamación, favorecen las funciones inmunológicas de las mucosas, así como las acciones efectoras de otros linfocitos. Por el otro, los linfocitos T $CD8^+$, o linfocitos T citotóxicos, eliminan las células infectadas que exponen epitopes asociados a CMH de clase I (Abbas et al., 2012). Las funciones específicas de cada subconjunto se discuten en detalle más adelante.

Luego de la eliminación de la fuente de antígeno (aunque este no sea exactamente el caso en las infecciones crónicas), tiene lugar la segunda fase de la respuesta T, denominada formalmente fase de contracción clonal. El proceso dominante de esta fase es la muerte por apoptosis de la enorme mayoría de los linfocitos T efectores activados, que permite devolver al sistema inmune al estado de homeostasis (Pulendran y Ahmed, 2006; Abbas et al., 2012). Sin embargo, la activación de los linfocitos T vírgenes no sólo genera una gran expansión de una población efectora seleccionada según su especificidad, sino que también da lugar a la diferenciación de un subconjunto de linfocitos T específicos que sobreviven más allá de la fase de contracción. Estas células tienen una capacidad distintiva de perpetuarse en el largo plazo, y de proliferar y adquirir función efectora muy rápidamente frente a una nueva activación (Laidlaw et al., 2016). Estos linfocitos T de memoria están presentes en circulación, pero son especialmente abundantes en órganos linfoides y en mucosas (Abbas et al., 2012). Dentro de esta población se distinguen dos conjuntos mayoritarios: los linfocitos T de memoria central (T_{CM}), dirigidos a

los nódulos linfáticos (CCR7⁺CD62L⁺)⁷, que por tener baja capacidad efectora pero alta sensibilidad a estimulación (dada por una menor dependencia de co-estimulación y mayor expresión de CD40L) y capacidad de proliferación frente a estímulo (frente a la estimulación, producen grandes cantidades de IL-2), se especializan en la protección a largo plazo; y los linfocitos T de memoria efectores (T_{EM}), dirigidos a tejidos periféricos (CCR7⁻CD62L^{+/+}), que son capaces de producir rápidamente citoquinas de perfil efector pero tienen capacidad proliferativa limitada (Sallusto et al., 2004; Lanzavecchia y Sallusto, 2005).

En ese sentido, se ha reportado un aumento en la frecuencia de linfocitos T_{CM} circulantes en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, tanto en fase asintomática como con sintomatología cardíaca, en comparación con individuos no infectados (Fiuza et al., 2009).

Hasta hace poco tiempo se consideraba que mientras los linfocitos T_{CM} eran los encargados de mantener el acervo de memoria inmunológica T, los T_{EM} eran los responsables de activar los mecanismos de protección más inmediata frente a una exposición secundaria. Si bien esto no es del todo incorrecto, se ha descrito recientemente un nuevo subconjunto denominado linfocitos T de memoria similares a células madre (T_{SCM}, por T stem cell-like memory), que representaría el estadio de diferenciación de mayor capacidad de auto-renovación y tendría el potencial de diferenciarse subsiguientemente a T_{CM} y luego a T_{EM}. Además, en cuanto a sus marcadores de superficie, son muy similares a las T_N (CD45RA⁺CCR7⁺CD62L⁺), excepto que además expresan CD95, el receptor de IL-2 β (IL-2Rβ) y el receptor de quimioquinas de motivo C-X-C 3 (CXCR3). Se sabe que circulan preferencialmente a través de los nódulos linfáticos y los órganos linfoides de mucosas, desde donde podrían activar una respuesta antigénica secundaria (Gattinoni et al., 2011; Sallusto y Lanzavecchia, 2011; Ahmed et al., 2016). Todo lo anterior sugiere fuertemente que las T_{SCM} constituyen la reserva primaria de linfocitos de memoria específicos, y que a partir de esta se generan los subtipos T_{CM}, T_{EM} y T_{TE} (por *terminal effector*, linfocitos T efectores terminalmente diferenciados) mediante un proceso de diferenciación lineal, en el que la célula progresivamente pierde capacidad proliferativa y de permanencia en tejidos linfoides, a medida que

⁷ CD62L, ligando de CD62, es un receptor involucrado en la extravasación de las células desde las vénulas endoteliales superiores.

gana capacidad efectora y de migración hacia el sitio de injuria o inflamación. Un dato no menor es que las poblaciones de linfocitos T de memoria no permanecen en estado de quiescencia en tanto no sean activadas, sino que su mantención implica un flujo dinámico permanente de pérdida de células por diferenciación y muerte, y ganancia por proliferación (Lanzavecchia y Sallusto, 2005).

Un fenómeno particular de alteración de las poblaciones de linfocitos T de memoria ocurre en situaciones de exposición antigénica persistente, como el caso de tumores e infecciones crónicas, incluida la enfermedad de Chagas crónica. Se trata de un programa de expresión génica diferente del que caracteriza a los subconjuntos de linfocitos T ya descritos, que tiene como consecuencia la pérdida de funcionalidad en los linfocitos específicos contra el antígeno de presencia persistente, y es conocido como agotamiento (*exhaustion*, a los linfocitos T afectados por este proceso se los denomina “exhaustos”). Se caracteriza por la pérdida jerárquica de funciones efectoras, expresión y utilización alteradas de factores de transcripción, desarreglos metabólicos, y expresión aumentada y mantenida de receptores tales como PD-1, CTLA-4, Tim-3, Lag-3 y TIGIT (Wherry y Kurachi, 2015; Anderson et al., 2016). En condiciones fisiológicas normales, todas estas moléculas participan en el control de la inflamación y la contracción de las poblaciones T efectoras, luego de la eliminación de la fuente de antígeno. Dado que el desarrollo de la memoria inmunológica T funcional requiere la ausencia de estimulación antigénica e inflamación persistente, las condiciones en las que se desarrolla el agotamiento de los linfocitos T redundan en una falla en la transición hacia la quiescencia inmunológica y la adquisición de una respuesta homeostática antígeno-independiente de los linfocitos T de memoria (Wherry y Kurachi, 2015).

En modelo murino de infección crónica con *T. cruzi*, se ha observado la falta en la producción de citoquinas en linfocitos T recuperados de infiltrados en tejidos, sugiriendo algún grado de disfuncionalidad (Leavey y Tarleton, 2003). A pesar de que algunos autores señalan que el cuadro desarrollado en la infección en ratón no se corresponde por completo con la descripción de un agotamiento de los linfocitos T (dos Santos Virgilio et al., 2014; Tarleton, 2015), estudios con muestras de pacientes con enfermedad de Chagas crónica han mostrado presencia de linfocitos T exhaustos, exhibiendo una relación directa entre su frecuencia y la severidad de la cardiopatía (Laucella et al., 2004; Albareda et al., 2013). Asimismo, se observó asociación entre el éxito

terapéutico del benznidazol en pacientes pediátricos y la pérdida de linfocitos T productores de IFN- γ específicos contra el parásito, en circulación periférica (Alvarez et al., 2016), apoyando la relevancia de un cuadro de estimulación antigénica persistente en la infección crónica como causal de una respuesta linfocítica T ineficaz en el largo plazo.

Habiéndose establecido este marco general del conocimiento disponible sobre los linfocitos T, y para facilitar su comprensión, se desarrollan a continuación, por separado, las particularidades de las interacciones entre *T. cruzi* y los linfocitos T citotóxicos por un lado, y los colaboradores por el otro.

Linfocitos T citotóxicos y eliminación de formas intracelulares de *T. cruzi*.

La activación de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes implica reconocimiento antigénico por parte del RCT en el contexto del CMH de clase I y segundas señales provistas por la CPA, o por otros linfocitos, especialmente linfocitos T colaboradores. Este último caso es especialmente relevante en situaciones en las que la presentación antigénica no es muy eficiente y la respuesta innata es relativamente débil, como es el caso de las infecciones latentes. El resultado de esta activación es la adquisición de la maquinaria molecular requerida para la eliminación de células blanco por parte del linfocito T CD8⁺, proceso que signa su diferenciación a linfocito T citotóxico. Más específicamente, se trata del desarrollo de gránulos citoplasmáticos conteniendo proteínas como perforinas y granzimas, que permitirán al linfocito la eliminación de otras células. Adicionalmente, se activa la producción de citoquinas, principalmente IFN- γ (Abbas et al., 2012).

Dado que la fase replicativa del ciclo vital de *T. cruzi* dentro del hospedero ocurre en el medio intracelular, la respuesta a linfocitos T citotóxicos ha sido el objeto predominante del estudio de la respuesta linfocítica en la enfermedad de Chagas en las últimas décadas. Se ha comprobado que los linfocitos T CD8⁺ son un componente esencial en el control de la infección (Junqueira et al., 2010), tal como se evidencia en modelos de ratón con esta población eliminada mediante anticuerpos (Tarleton, 1990) y en transgénicos deficientes en linfocitos T CD8⁺ (*knock-out* para β 2-microglobulina, Tarleton et al., 1992), que no logran sobrevivir a la fase aguda de la infección. Se sabe, además, que la secreción de IFN- γ es crucial para esta función protectora de los linfocitos T CD8⁺, (Junqueira et al., 2010) y que uno de los mecanismos por los que esta citoquina media la protección es la inducción de producción de NO.

Sin embargo, no sería el único, puesto que ratones *knock-out* para IFN- γ tienen un fenotipo diferente de los *knock-out* para iNOS, presentando mayor severidad y siendo más similar al de ratones deficientes dobles en linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (Martin y Tarleton, 2004). En la infección humana, se ha comprobado una reducción en la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ en pacientes con cardiopatía severa respecto de los pacientes asintomáticos y con cardiopatía moderada, sugiriendo que la respuesta T citotóxica juega un rol en prevenir el avance de la sintomatología cardíaca (Albareda et al., 2006).

No obstante, y dada la evidencia experimental y clínica, la aparición de una respuesta a linfocitos T CD8⁺ específica contra epítopes de *T. cruzi* no implica protección frente a la infección/reinfección. Investigaciones diversas han tratado de esclarecer la razón por la cual no se establece una memoria inmunológica capaz de montar una respuesta a linfocitos T citotóxicos frente al parásito. Una particularidad de este sistema, y que probablemente sea compartida con otros organismos parasitarios con fases replicativas intracelulares, es que la expansión y contracción de los linfocitos CD8⁺ (evaluada experimentalmente como actividad citotóxica y frecuencia de células productoras de IFN- γ específicas contra un epítopo de TcTS y uno de ASP-2) ocurren con un cierto retraso en respuesta a la infección aguda, en comparación con los tiempos habituales observados para virus y bacterias (Tzelepis et al., 2006). Una explicación posible para este fenómeno es la posibilidad de que la infección inicial pasa desapercibida para el sistema inmune, y por ende no ocurra una activación efectiva de la respuesta innata antes de la primera ronda de replicación y reinfección celular, que tiene lugar alrededor de 4-5 días post-infección (Tzelepis et al., 2006; Padilla et al., 2009).

A esta posible dificultad para generar una respuesta efectiva en el contexto de la infección primaria, se suma el efecto de la estimulación antigénica persistente propia de la infección crónica sobre el mantenimiento de una población de memoria funcional. En pacientes con enfermedad de Chagas crónica, en comparación con sujetos no infectados por *T. cruzi*, se ha visto un desbalance entre las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ de memoria, reportándose una menor frecuencia de linfocitos T_{SCM} asociada a una mayor frecuencia de T_{TE} (Mateus et al., 2015). En conjunto con la observación de una mayor frecuencia de linfocitos T CD8⁺CD45RA⁺IFN- γ ⁺ en pacientes con

cardiopatía respecto de pacientes asintomáticos e individuos no infectados⁸ (Fiuza et al., 2009) concuerda con la hipótesis de agotamiento progresivo de la respuesta T citotóxica. Consistentemente, se observó un aumento en la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ monofuncionales⁹ (frente a estimulación *in vitro* con lisado de parásito) en pacientes con cardiopatía severa (Mateus et al., 2015) y de células de este tipo con expresión de CTLA-4 en superficie en pacientes asintomáticos (Souza et al., 2007). Por otra parte, aunque en este estudio no se observó aumento en la expresión de CTLA-4 en superficie en linfocitos T CD8⁺ de pacientes con cardiopatía, pudo evidenciarse un incremento en la frecuencia de células con marca intracelular positiva para este receptor (Souza et al., 2007). En discordancia parcial, un estudio posterior indica una frecuencia significativamente aumentada de linfocitos T CD8⁺ que expresan dicho receptor en pacientes con enfermedad de Chagas, con y sin sintomatología (Argüello et al., 2012). Adicionalmente, se ha demostrado, dentro de los linfocitos T CD8⁺ circulantes, una disminución del subconjunto T_{EM} en favor de un aumento de las T_{TE}, sugiriendo que la protección mediante respuesta citotóxica frente al avance de la patología depende de la existencia de un número alto de linfocitos T CD8⁺ de memoria competentes, esto es, en estadios de diferenciación no terminales (Costa et al., 2000; Albareda et al., 2006).

Otra arista de esta disfuncionalidad de la respuesta es la observación de un funcionamiento deficiente del eje CD28-IL-2 puesto que la señalización por IL-2 es necesaria para la supervivencia de los linfocitos T activados y la generación y el mantenimiento de la memoria, es probable que una menor secreción de esta citoquina conlleve no sólo a una respuesta efectora disminuida, sino también a la eliminación física de clones específicos activados de linfocitos T (Albareda et al., 2006; Alvarez et al., 2008).

Con respecto a la especificidad de la respuesta T CD8⁺, se han descrito numerosos epitopes, siendo los provenientes de proteínas de la familia de las trans-sialidasas los más estudiados. En particular, TSKb20, un péptido surgido de la predicción informática de epitopes con unión a la molécula de CMH clase I de ratón H-2K^b, ha demostrado un alto grado de inmunodominancia en modelo

⁸ Aunque los autores proponen que, dada su expresión de CD45RA, se trata de linfocitos T CD8⁺ vírgenes, bien podría en realidad tratarse de poblaciones T_{TE}.

⁹ La polifuncionalidad de linfocitos T, en tanto diversidad de citoquinas producidas frente a la activación, es una característica asociada a una mejor función protectora, y su pérdida suele relacionarse con agotamiento de la respuesta específica.

de infección murina, llegando a alcanzar valores de hasta un 30% de linfocitos T CD8⁺ específicos observados mediante tinción citométrica con tetrámeros de CMH (Martin et al., 2006; Tzelepis et al., 2008). Esta característica ha llevado a algunos autores a proponer que la concentración de gran parte de la respuesta en unos pocos epitopes podría constituir una estrategia de evasión inmunitaria (Tzelepis et al., 2008), pero resultados posteriores demostraron que inducir tolerancia frente al epítipo TSKb20 tiene un efecto negativo sobre el control de la parasitemia. Esto invalidaría la hipótesis de que la inmunodominancia de epitopes de TcTS contribuye al escape del parásito por impedir el desarrollo de una respuesta más amplia (Padilla et al., 2009). Más aún, a pesar de que a menudo se extrapola la observación de epitopes inmunodominantes de TcTS a la infección por *T. cruzi* en general, no hay a la fecha información experimental publicada que documente su existencia en la infección humana. Una aproximación predictiva similar, pero para la familia (supertipo) HLA-A2 de moléculas de CMH humano clase I, llevó al descubrimiento de epitopes similares de trans-sialidasa, denominados TSA2-x donde x reemplaza a un identificador numérico de cada péptido individual, que demostraron diversos grados de reactividad en experimentos de ELISPOT con muestras de pacientes crónicos HLA-A*02:01⁺ (Martin et al., 2006)¹⁰.

La familia de las trans-sialidasas y proteínas relacionadas ha despertado particularmente el interés de los investigadores en inmunología de los linfocitos T en enfermedad de Chagas. Sumado a lo ya mencionado sobre su rol en el escape y la inmunomodulación, y a la existencia de epitopes T contenidos en estas proteínas, se sabe que es un conjunto extremadamente diverso, con alrededor de 1.400 variantes proteicas anotadas en el genoma de *T. cruzi* cepa CL Brener, y un estimado de otras 1.800 variantes sin anotar. Por el contrario, *Leishmania* carece de esta familia y *T. brucei* sólo tiene 6, lo cual sugiere que esta familia se expandió extraordinariamente al divergir *T. cruzi* de los demás tripanosomátidos (Padilla et al., 2009). Desde un punto de vista evolutivo, es tentador especular respecto de la relevancia de este fenómeno al éxito de *T. cruzi* como organismo parasitario, y en consecuencia tener alguna relevancia clínica.

¹⁰ En el trabajo de Martin *et al.*, los pacientes se describen como HLA-A2.1⁺, en función de una nomenclatura para los alelos de HLA actualmente en desuso.

Otras moléculas que contienen epitopes T CD8⁺ de *T. cruzi*, y que han sido confirmadas como inmunogénicas en muestras de pacientes HLA-A02:01⁺, son el péptido 77.2 de la proteína TSA-1 (Wizel et al., 1997), las proteínas de superficie de amastigotes ASP-1 y -2 (Low et al., 1998), las proteínas de bastón paraflagelar TcPRP-2 y -3 (Egui et al., 2012), cruzipaína y FL-160 (Fonseca et al., 2005), dentro de la familia de las trans-sialidasas. Por fuera de la misma se encuentra a la proteína de la membrana del kinetoplasto KMP-11 reconocida por pacientes con enfermedad de Chagas crónica, y sin confirmación de respuesta en humanos, se encuentran LYT-1, β -adaptina, la proteína paraflagelar de unión a Ca⁺² y la proteína de respuesta a choque térmico (HSP), todas ellas de inmunogenicidad verificada en modelo de infección murina (Fralish y Tarleton, 2003; Martin y Tarleton, 2004).

Es interesante mencionar que, independientemente de su especificidad, se ha observado una expansión en pacientes con enfermedad de Chagas de la población de células expresando la variante de receptor de linfocito T TCR-V β 3.1 en linfocitos T CD8⁺CD28⁺ (Menezes et al., 2004), sugiriendo una activación preferencial de esta familia de RCT frente al parásito.

Numerosas investigaciones han intentado determinar la frecuencia y fenotipo de los linfocitos T CD8⁺ específicos contra *T. cruzi* utilizando epitopes del parásito (TSA-1, ASP-1 y -2, CaBP, LYT-1) con aproximaciones basadas en ensayos de ELISA, ELISPOT y marcación intracitoplasmática de citoquinas (ICS, por *Intracellular Cytokine Staining*). El éxito de estas estrategias se ha visto fuertemente limitado por la baja frecuencia de estas células en los pacientes crónicos (Laucella et al., 2004; Martin y Tarleton, 2004; Martin et al., 2006). Esta baja frecuencia de células específicas fue observada en particular para *T. cruzi*, en comparación con la respuesta a un péptido de virus de influenza evaluada en paralelo sobre las mismas muestras. Evidencia que apuntaba en el mismo sentido ya había sido obtenida en modelo murino, utilizando parásitos transgénicos que expresan el antígeno heterólogo OVA en forma secretoria o anclada a GPI. Los resultados indicaron una expansión inicial de linfocitos T CD8⁺ OVA-específicos, pero que son mantenidos sólo en bajas frecuencias (Garg et al., 1997). Diferentes mecanismos fueron propuestos para explicar esta observación. Uno de ellos involucra la diversidad de péptidos incorporados al mecanismo de procesamiento y presentación del CMH clase I: al exponerse una gran cantidad de péptidos diferentes en la superficie de la célula presentadora, puede que estos epitopes compitan por la presentación y

ninguno alcance una densidad suficiente como para superar el umbral de activación del RCT. Otra hipótesis es la de la pérdida de función efectora y supresión en los tejidos periféricos (Laucella et al., 2004; Martin y Tarleton, 2004).

Además de participar, con los matices ya mencionados, en la eliminación del parásito en el marco de la infección, un cuerpo de evidencia notable sugiere que los linfocitos T CD8⁺ están también involucrados en el daño tisular y los procesos inflamatorios característicos de la enfermedad de Chagas sintomática (Engman y Leon, 2002; Scharfstein et al., 2009; Bonney y Engman, 2015). Los infiltrados inflamatorios en pacientes con las formas cardíaca o digestiva de la enfermedad son ricos en linfocitos T CD8⁺ activados, y estos expresan las moléculas citolíticas granzima y TIA-1¹¹ (Lannes-Vieira, 2003; da Silveira et al., 2007; Dutra y Gollob, 2008). Se ha reportado también una predominancia de células productoras de citoquinas pro-inflamatorias en pacientes con cardiopatía (Fonseca et al., 2007), aunque estudios comparativos del perfil de citoquinas entre pacientes asintomáticos y con cardiopatía arrojaron resultados discordantes: algunos autores afirman que la secreción de IFN- γ tiene un efecto protector frente al desarrollo de sintomatología (Laucella et al., 2004; dos Santos Virgilio et al., 2014; Dutra et al., 2014), mientras que otros proponen un efecto nocivo de esta citoquina pro-inflamatoria sobre la función cardíaca (Gomes et al., 2003, 2005; Dutra et al., 2014). Se ha sugerido una relación entre el perfil de linfocitos T CD8⁺ enriquecido en T_{TE} en pacientes con cardiopatía de mayor severidad y el daño cardíaco en sí, dada la mayor capacidad citotóxica de este subconjunto (Mateus et al., 2015). En función de la evidencia acumulada en este sentido, la hipótesis más favorecida pone en relieve la importancia de la regulación de la respuesta para lograr un balance entre una actividad efectora eficaz y el control del daño inflamatorio.

Es interesante destacar un estudio reciente, en el que se logra demostrar que los linfocitos T citotóxicos tienen una acción tripanocida directa sobre los parásitos intracelulares y circulantes, para la cual es necesaria la enzima granulolisina (Dotiwala et al., 2016). Los resultados de esta investigación mostraron que, aunque no es necesaria para la eliminación de la célula huésped infectada mediante la acción de la perforina y la granzima B, la granulolisina es

¹¹ TIA-1 (*T cell Intracellular Antigen*) es una proteína implicada en la muerte celular por la activación de la vía FAS/FAS-L.

requerida para observar un efecto sobre la viabilidad de los parásitos intracelulares. Los autores proponen que las granzimas ingresan a la célula infectada por acción de la perforina, y una vez allí penetran en los amastigotes por acción de la granulolisina. En cuanto a los tripomastigotes circulantes, se vio que la granzima B sólo es capaz de afectarlos en presencia de granulolisina. El proceso de muerte celular inducido por los linfocitos T citotóxicos sobre los parásitos es similar a la apoptosis (los autores proponen designarlo con el término “microptosis”), con hinchamiento y pérdida de crestas en la mitocondria, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y *blebbing* de la envoltura celular. El mecanismo también involucra actividades enzimáticas similares a la de las caspasas en las células de mamífero y producción de especies oxidantes de oxígeno y nitrógeno, y pudo observarse tinción con anexina V y yoduro de propidio (Dotiwala et al., 2016). Llamativamente, la granulolisina está ausente en roedores, lo cual pone en evidencia ciertas limitaciones del modelo murino clásico para el estudio de la respuesta citotóxica en el contexto de la enfermedad de Chagas. En el mismo estudio, se mostró cómo ratones en los que se introducía esta enzima por ingeniería genética controlaban mejor la infección y el daño tisular cardíaco, logrando una mayor supervivencia (Dotiwala et al., 2016).

Los mecanismos que favorecen y perjudican la inmunidad mediada por linfocitos T CD8+ frente a la infección por *T.cruzi* se resumen esquemáticamente en la **Figura 8**.

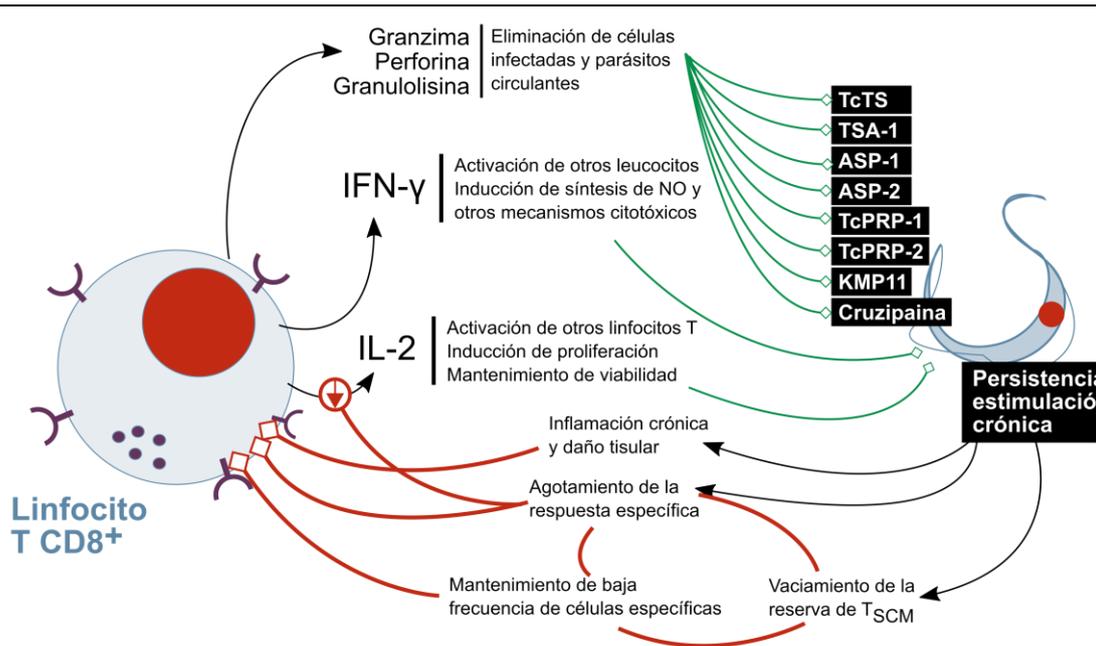


Figura 8

Los linfocitos T CD8⁺ juegan un rol fundamental en el control de la parasitemia y la eliminación de células infectadas por *T. cruzi*, pero su estimulación crónica perjudica su función. Además, se cree que participan en los procesos inflamatorios patogénicos propios de la enfermedad de Chagas. Se ilustran en verde los factores que se consideran beneficiosos y en rojo los que se consideran perjudiciales para el hospedero. La flecha roja encerrada en un círculo indica cambio en la secreción de citoquinas.

Linfocitos T colaboradores y modulación de la respuesta inmune específica

Los linfocitos T CD4⁺ se caracterizan por expresar moléculas de superficie y secretar citoquinas que modulan la actividad de otras células, principalmente macrófagos, células dendríticas y otros linfocitos (Abbas et al., 2012). Luego de activarse, los linfocitos T estimulan, vía CD40L, a las células dendríticas que han entrado en contacto con patógenos y promueven su maduración, así como la producción de quimioquinas y citoquinas polarizadoras de la respuesta, función que es necesaria para la inducción de una respuesta T citotóxica apropiada. Algunos linfocitos T CD4⁺ activados aumentan su expresión de CXCR5 que dirige su migración hacia los folículos de linfocitos B en órganos linfoides, donde interactúan con linfocitos B y se diferencian en linfocitos T colaboradores foliculares (T_{FH}), especializados en favorecer la selección de linfocitos B específicos e inducir su producción de anticuerpos de alta afinidad. La gran mayoría de los linfocitos T CD4⁺ que entran en fase proliferativa gracias a su activación se diferencian en alguno de los múltiples

perfiles de linfocitos T_H , adquiriendo diferentes propiedades migratorias y efectoras, e ingresan en circulación para extravasarse en los tejidos periféricos inflamados. Allí, frente al reconocimiento antigénico, producen citoquinas acordes a su perfil para potenciar la actividad de las células inmunitarias localmente presentes. La diversidad de fenotipos de T_H generados en la respuesta primaria a una infección es importante, puesto que se verá reflejada en la diversidad de linfocitos T de memoria que persistirán más allá de la infección (Sallusto, 2016).

Se sabe que en el modelo murino de infección crónica por *T. cruzi*, los linfocitos $T CD4^+$ forman una parte importante de los infiltrados en las lesiones cardíacas, lo cual podría sugerir que son de importancia en la respuesta frente al parásito (Ben Younes-Chennoufi et al., 1988). No obstante, y posiblemente gracias a que su importancia fisiológica es indirecta, es decir, por medio de la colaboración con otras células, se sabe muy poco sobre el rol que cumplen en la enfermedad de Chagas, especialmente en comparación con la extensión en la que ha sido estudiada la respuesta a linfocitos $T CD8^+$. Un modelo de infección en ratones *knock-out* para moléculas de CMH clase II empleado para evaluar la importancia de la colaboración entre los linfocitos $T CD4^+$ y $CD8^+$ permitió establecer que las primeras no son absolutamente necesarias para establecer una respuesta T citotóxica. No obstante, el perfil de especificidad y los patrones migratorios de los linfocitos $CD8^+$ expandidos no fueron iguales que en los ratones del grupo control (no mutantes), y los animales modificados presentaron una susceptibilidad mucho mayor a la infección, pereciendo frente a esta a tiempos relativamente cortos (Padilla et al., 2007). Esto no solo limita la utilidad de este modelo para el estudio del rol de los linfocitos T colaboradores en la infección crónica por *T. cruzi*, sino que pone de manifiesto que, a pesar de no ser esenciales para la generación y expansión de linfocitos T citotóxicos, los linfocitos $T CD4^+$ son importantes para el control de la infección y/o la inflamación.

La variedad de distintos perfiles de linfocitos T_H está estrechamente relacionada con su función, puesto que la predominancia de uno u otro en la respuesta depende de la naturaleza del patógeno, y permite, consecuentemente, activar los mecanismos más convenientes para su eliminación (Annunziato y Romagnani, 2009; Abbas et al., 2012). Estos perfiles se definen en función de la producción de citoquinas y expresión de factores de transcripción característicos (Sallusto, 2016). Así, los linfocitos T_H1 producen altos niveles de $IFN-\gamma$ y

potencian la fagocitosis y la producción de anticuerpos opsonizantes y fijadores de complemento, mediando la protección frente a patógenos intracelulares. Su factor de transcripción de expresión distintiva es T-bet. Por otra parte, los linfocitos T_H2, definidos por la expresión de GATA-3, producen IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que activan mecanismos involucrados en la eliminación de helmintos y otros parásitos pluricelulares similares (Annunziato y Romagnani, 2009; Sallusto, 2016). A su vez, y en relación con el tipo de patógeno al que responden, mientras que un perfil T_H1 guía la producción de anticuerpos IgM, IgA, IgG₁, IgG₂ e IgG₃, uno T_H2 induce la producción de IgM, IgG₄ e IgE (Annunziato y Romagnani, 2009).

Resultados obtenidos en modelo murino sugieren que, en cuanto al nivel de protección que proveen uno u otro perfil frente a la infección por *T. cruzi*, es deseable una respuesta coordinada entre ambos perfiles (Silva et al., 1992; Petray et al., 1993), con predominancia, según algunos autores, de mecanismos efectores T_H1 para el control/la eliminación del parásito (Rodrigues et al., 1999; Kumar y Tarleton, 2001; Hoft y Eickhoff, 2005). El modelo de infección en ratón ha permitido descubrir que algunas enzimas del parásito afectan la fisiología de los linfocitos T CD4⁺ de diversas maneras, constituyendo potenciales mecanismos de evasión: dos enzimas de la familia de las trans-sialidasas (una con actividad trans-sialidasa propiamente dicha, y otra sin ella), inhiben su expansión y promueven un perfil de citoquinas T_H2, según proponen los autores al observar una disminución en la secreción de IFN- γ y aumento en la de IL-4 (Díaz et al., 2015). En concordancia, se evidenció una disminución en la expresión de IL-2 y su receptor (IL-2R α , CD25), así como una disminución en la señalización por el RCT, y se demostró que la IL-10 es requerida para que este fenómeno ocurra. Puesto que la actividad trans-sialidasa de la enzima parece no participar en esta modulación, los autores proponen que en realidad el mecanismo que genera estos efectos es de tipo unión de lectinas a glicoproteínas de superficie (Díaz et al., 2015). De manera similar, se observó que TcMuc, una sialoglicoproteína de la superficie de *T. cruzi*, produce efectos similares sobre la expresión de IL-2 y CD25, y por ende en la proliferación de los linfocitos T CD4⁺, aunque en este caso la inhibición de secreción de citoquinas fue más general, afectando no sólo a IFN- γ , sino también a IL-4, IL-10 y TGF- β (Nunes et al., 2013). El mecanismo operante en este caso parecería ser la unión de SIGLEC-E (tal y como se describió para las células dendríticas), lo cual se apoya en la disminución de los efectos observados al des-sialilar la proteína

TcMuc (Nunes et al., 2013). Otra molécula que modula la función de estos linfocitos es la proteína de membrana de kinetoplastidos 11 (KMP-11), que disminuye la secreción de IFN- γ frente a la activación, sin afectar la de IL-4 (Cuéllar et al., 2009). Los cuatro agentes mencionados, las trans-sialidasas activa e inactiva, la TcMuc y la KMP-11, afectan a la totalidad de la población de linfocitos T CD4⁺ independientemente de su especificidad (Cuéllar et al., 2009; Nunes et al., 2013; Díaz et al., 2015). En la **Figura 9** se ejemplifican algunas de las vías implicadas en el balance entre la eliminación del parásito y la inflamación patológica nociva.

En la infección humana, Albareda *et al.* (2009) demostraron una asociación de una menor frecuencia de linfocitos CD4⁺ específicos contra *T. cruzi* productores de IFN- γ con el grado de severidad de pacientes con cardiopatía chagásica crónica. Los resultados de este trabajo sugieren además que la mayoría de los linfocitos T CD4⁺ parásito-específicos circulantes en pacientes son células recientemente reclutadas y tienen un perfil efector altamente diferenciado, e incluso, en los casos de cardiopatía más severa, presentan marcadores de apoptosis, mientras que una fracción minoritaria tiene un fenotipo esperable de una memoria inmunológica de largo plazo (Albareda et al., 2009). Esta evidencia favorece la hipótesis de agotamiento de la respuesta T en el contexto de la enfermedad de Chagas crónica. Adicionalmente, experimentos de estimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica y análisis de secreción de citoquinas mostraron que los antígenos del parásito inducen en pacientes con cardiopatía chagásica crónica un perfil de secreción de citoquinas que no encaja completamente con ninguno de los mencionados, presentando mezcla de citoquinas típicamente T_H1 (IFN- γ , TNF- α), T_H2 (IL-4, IL-13), además de IL-2, IL-10 (que tiene función inmunosupresora, como se discute más adelante) y GM-CSF (una citoquina que favorece la producción de neutrófilos y monocitos en la médula ósea, y la diferenciación de las células de Langerhans en células dendríticas maduras) (Longhi et al., 2014). La secreción de GM-CSF, IL-10 y TNF- α fue atribuida parcialmente a la respuesta frente a proteínas ribosomales del parásito que, como se expuso anteriormente, están relacionadas con fenómenos de autoinmunidad humoral.

Una tercer subpoblación de linfocitos T_H, los T_H17, contribuyen a la respuesta frente a patógenos, aunque las primeras investigaciones al respecto pusieron énfasis en su rol patológico, especialmente en modelos de enfermedad

autoinmune o de inflamación crónica. No obstante, también se ha acumulado evidencia en favor de su rol protector frente a la infección por patógenos diversos, tales como bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras y micobacterias (Bettelli et al., 2008). En humanos, se caracterizan por la expresión del factor de transcripción RORC y los receptores CCR6, CCR4, IL-23R y CD161. Producen las citoquinas IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-26, y la quimioquina CCL20 (Annunziato y Romagnani, 2009; Abbas et al., 2012). Es importante mencionar que una alta proporción de estas células producen IFN- γ en conjunto con IL-17A, lo que ha llevado a proponer la caracterización de un subconjunto T_{H17}/T_{H1} , para diferenciarlo de las T_{H17} y de las T_{H1} . Su importancia fisiológica es aún hoy motivo de debate, puesto que los efectos de su actividad suelen variar dependiendo de la patología de contexto y el modelo en el que se observen (Annunziato y Romagnani, 2009). Algunas de las controversias suscitadas respecto al rol protector/patológico de estas células fueron esclarecidas, al menos en parte, al demostrarse la existencia de plasticidad que permitiría a los linfocitos T_{H17} diferenciarse a T_{H1} , pero no a la inversa. Para intentar resumir las funciones de los linfocitos T_{H17} , se cree que es principalmente el reclutamiento y activación de granulocitos/neutrófilos por activación, mediada por IL-17A, de la producción de factores estimulantes de colonias y CXCL8 por parte de macrófagos y células residentes tisulares (Bettelli et al., 2008; Annunziato y Romagnani, 2009; Sallusto, 2016). Por su parte, IL-21 e IL-22 participan en la activación de células mononucleares y/o residentes tisulares, y podrían así inducir o mantener un proceso inflamatorio crónico (Bettelli et al., 2008; Annunziato y Romagnani, 2009).

Se ha demostrado que los linfocitos T_{H17} pueden ejercer una potente función protectora frente a la infección por *T. cruzi* en ratones, al activar la producción de especies oxidantes en células infectadas mediante la acción de IL-17A y los mecanismos efectores de los linfocitos T citotóxicos mediante la acción de IL-21 (Cai et al., 2016). En este trabajo, la utilización de transferencia adoptiva de linfocitos T_{H1} y T_{H17} específicos contra p7, un epítipo de transglutaminasa inmunodominante en este modelo experimental, evidenció una mayor capacidad protectora de las segundas en comparación con las primeras frente a la infección con *T. cruzi*. Aunque se ha aprendido que la respuesta T_{H17} en la infección murina está fuertemente regulada por citoquinas de la familia de IL-12 (Cobb y Smeltz, 2012) y que los linfocitos T $CD4^+$ de este perfil forman parte de los infiltrados inflamatorios en corazón en el mismo modelo (Sanoja

et al., 2013), la importancia funcional de esta subpoblación celular aún no ha sido esclarecida.

Los avances en las tecnologías utilizadas para el estudio de la biología de los linfocitos T y en el conocimiento generado en los últimos años en este campo han permitido distinguir otros subconjuntos funcionales de linfocitos T_H, tales como los T_H9 y los T_H22. No obstante, su descripción implicaría ahondar en detalles que no son de relevancia para la contextualización de este trabajo de Tesis. Además, a la fecha, no existen trabajos publicados respecto a su importancia en el contexto de la infección por *T. cruzi*.

Existe un subconjunto de linfocitos T CD4⁺ cuya función es la de operar mecanismos de tolerancia por medio de una acción en *trans* sobre otros linfocitos T, con el fin de restringir respuestas inmunes potencialmente patogénicas. Esta población, conocida como linfocitos T regulatorios (T_{reg}), expresa constitutivamente una alta densidad de CD25 (cadena α del receptor de IL-2) y del factor de transcripción FoxP3, que dirige su programación transcripcional (Abbas et al., 2012; Josefowicz et al., 2012). Su diferenciación a partir de linfocitos T CD4⁺ vírgenes depende de señalización por IL-2 y TGF- β , y su mantenimiento y expansión depende de IL-2. En condiciones fisiológicas, se generan principalmente por reconocimiento de autoantígenos en el timo, así como de antígenos propios y foráneos en los órganos linfoides periféricos. Su función inmunoregulatoria está mediada por IL-10 y TGF- β : IL-10 inhibe la producción de IL-12 e inhibe la expresión de moléculas co-estimuladoras y moléculas de CMH clase II en células dendríticas y macrófagos activados; y TGF- β inhibe la proliferación y función efectora de los linfocitos T y macrófagos, inhibe la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ activados hacia T_H1 y T_H2, induce el *switch* de clase hacia IgA en linfocitos B activados y promueve la reparación local de tejido en la remisión de la inflamación (Abbas et al., 2012). El co-receptor inhibitorio CTLA-4 y las exoenzimas CD39 y CD73 (que intervienen en el equilibrio adenosina-cAMP, afectando esta vía de señalización) también están involucrados en la función supresora de las T_{reg} (Josefowicz et al., 2012).

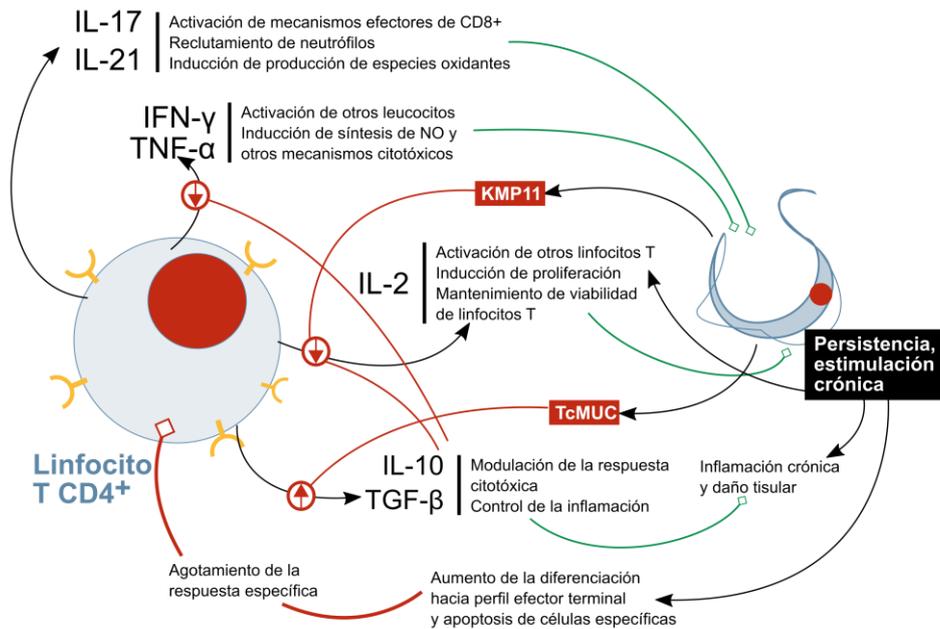


Figura 9

Los linfocitos T CD4⁺ activan, potencian o modulan mecanismos de la respuesta inmune frente a la infección por *T. cruzi*. El control de la enfermedad requiere de una respuesta balanceada en la que existe un compromiso entre la activación de funciones microbicidas y el control del daño inflamatorio. Se ilustran en verde los factores que se consideran beneficiosos y en rojo los que se consideran perjudiciales para el hospedero. Los factores en recuadros rojos modifican la secreción de citoquinas según indican las flechas rojas encerradas en círculos.

Dada la relevancia clínica del control de la inflamación tisular en la enfermedad de Chagas crónica, los linfocitos T_{reg} han despertado interés en este campo de investigación. Así, se llegó a determinar que esta población de linfocitos está aumentada en pacientes asintomáticos en comparación con aquellos que desarrollaron sintomatología cardíaca o digestiva (Vitelli-Avelar et al., 2005; da Silveira et al., 2009). Asimismo, se comprobó la existencia de linfocitos T_{reg} activados, produciendo IL-10, tanto en pacientes con enfermedad de Chagas asintomática como con cardiopatía asociada a la infección (de Araújo et al., 2011). En modelo murino, se descartó su actividad, y en particular la producción de TGF- β , como causas de la falta de producción de citoquinas por parte de linfocitos T efectoras, aislados a partir de infiltrados inflamatorios de corazón infectado por *T. cruzi* (Kotner y Tarleton, 2007; Martin et al., 2007).

Finalmente, es importante destacar que la especificidad de los linfocitos T CD4⁺ en la enfermedad de Chagas ha sido escasamente explorada, quizás como consecuencia de la ya mencionada dificultad de observar su efecto colaborador sobre otros tipos celulares. Un estudio sobre la expresión de familias de RCT

indicó una representación aumentada de células expresando V β 5 (Menezes et al., 2004). Otros autores señalaron una frecuencia incrementada de las familias V β 4, V β 5, V β 11, V β 13, V β 17 y V β 20 asociada a una menor representación de las familias V β 2, V β 3, V β 6, V β 14, V β 15 y V β 16. Adicionalmente, indicaron que la frecuencia de células expresando V β 7 está significativamente aumentada en pacientes con arritmia asociada a enfermedad de Chagas en contraste con los grupos de pacientes con falla cardíaca congestiva y sin sintomatología (Fernández-Mestre et al., 2002). Toda esta información es sugerente de una selección de poblaciones de linfocitos T CD4⁺ en proceso, incluso durante la enfermedad crónica. Los epitopes restringidos a CMH clase II hasta la fecha corresponden a proteínas de la familia de las transglutaminasas (Kahn y Wleklinski, 1997), la tiol-transferasa Tc52 (Borges et al., 2003), la proteína flagelar de unión a Ca⁺² 3 (Taibi et al., 1993), la proteína de superficie asociada a mucinas (MASP, Serna *et al.*, 2014) y la proteína B13 (Abel et al., 2005; Iwai et al., 2005). Para esta última, no se evidenció respuesta *in vitro* diferencial entre los pacientes con enfermedad de Chagas (y con distinto grado de compromiso cardíaco) e individuos no infectados (Abel et al., 2005). Además, se logró encontrar motivos de esta proteína que presentan reactividad cruzada con la cadena pesada de miosina humana, y linfocitos T con esta especificidad fueron aislados de lesiones cardíacas de un paciente con enfermedad de Chagas crónica (Cunha-Neto et al., 1996; Iwai et al., 2005). Sin embargo, es importante mantener en vista que, a excepción de B13, todos los antígenos mencionados surgen de estudios de restricción en modelos de infección en roedores, y dado que las moléculas de CMH son sensiblemente diferentes entre el humano y estos animales de laboratorio, es esperable encontrar diferencias en los epitopes reactivos entre estas especies.

2. Hipótesis y objetivos.

En función del contexto expuesto en la Introducción, resulta evidente la importancia de comprender los factores que rigen la respuesta inmune frente a la infección por *T. cruzi*. En particular, el estudio de la memoria inmunológica de linfocitos T y su especificidad en el contexto de la enfermedad de Chagas crónica podría, más allá de aportar al conocimiento básico sobre este mecanismo de defensa, contribuir al desarrollo de vacunas profilácticas y/o terapéuticas, así como al diseño de tratamientos de inmunointervención.

El objetivo general de este trabajo de Tesis fue el estudio de la especificidad de la respuesta inmune de memoria mediada por linfocitos T, generada frente a la infección por *T. cruzi* en humanos. Para ello, hemos planteado dos aproximaciones complementarias, cada una con sus propios objetivos específicos:

Aproximación I. Expansión y detección *ex vivo* de linfocitos T de memoria específicos contra *T. cruzi* de pacientes con enfermedad de Chagas crónica

- Evaluar los efectos de variables experimentales de los protocolos de cultivo celular en la expansión *ex vivo* de linfocitos T de memoria específicos contra *T. cruzi* a partir de CMN de pacientes con enfermedad de Chagas crónica asintomática y con cardiopatía chagásica crónica.
- En función de los resultados del objetivo anterior, optimizar el método para la generación de líneas de linfocitos T específicos contra *T. cruzi* a partir de

linfocitos T CD4⁺ de memoria de pacientes con enfermedad de Chagas crónica asintomática.

- Aislar, a partir de líneas policlonales, clones de linfocitos T CD4⁺ específicos contra *T. cruzi* y amplificarlos *in vitro* para generar líneas celulares clonales.

Aproximación II. Predicción bioinformática y validación de epitopes inmunogénicos de *T. cruzi*.

- Identificar, mediante la utilización de algoritmos bioinformáticos de predicción de péptidos con capacidad de unión a moléculas de CMH clases I y II, posibles epitopes de *T. cruzi*, activadores de respuesta inmune celular.
- Evaluar la reactividad *in vitro* de CMN de pacientes con enfermedad de Chagas crónica frente a los péptidos identificados en el objetivo específico anterior.
- Evaluar la cobertura poblacional de la respuesta frente a esos péptidos.
- Caracterizar el perfil de la respuesta inducida por los epitopes validados.

3. Materiales y métodos.

3.1. Soluciones y medios de cultivo.

PBS/PBS-Tw

NaCl 0,15 M
NaH₂PO₄ 2,5 mM
Na₂HPO₄ 7,4 mM
(pH 7,4)

PBS-Tw: + 0,05% v/v del detergente no iónico Tween-20.

Solución de Carbonato de Sodio

Na₂CO₃ 15 mM
NaHCO₃ 35 mM
(pH 9,6)

Solución de bloqueo de ELISA

PBS + 10% suero fetal bovino (SFB, Natocor, Córdoba, Argentina)

Medios RPMI-SFB/RPMI-SFB3/ RPMI-SH

Para todos estos medios se utilizó de base:

RPMI 1640 (contiene HEPES y rojo fenol en su formulación comercial)

L-glutamina 2 mM
Penicilina 100 U/ml
Estreptomicina 100 µg/ml

RPMI-SFB: + 10% v/v SFB

RPMI-SFB3: + 3% v/v SFB

RPMI-SH: + 5% v/v suero humano (AB Rh-positive human serum;
Sigma, St Louis, EE. UU.)

Medio LIT

Infusión de hígado (<i>Liver Infusion</i>)	0,5% p/v
Triptona	0,5% p/v
NaCl	67,8 mM
KCl	5,3 mM
Na ₂ HPO ₄	22 mM
D-Glucosa	11,1 mM
SFB	10% v/v
Penicilina	100 U/ml
Estreptomina	100 µg/ml
Hemina	10 mg/l

Medio de separación inmunomagnética

PBS + SFB 2% v/v y EDTA 1 mM

Solución de lisis de epimastigotes

MgCl ₂	5 mM
Acetato de Potasio (K ⁺ CH ₃ COO ⁻)	25 mM
Ditiotreitol (DTT)	1 mM
Sacarosa	250 mM
Tritón X100 (detergente no iónico)	1% v/v
Solución Tris-HCl 1M pH 7,4	2 ml (conc. final Tris: 20 mM)
cOmpete (inhibidor de proteasas, Roche, Alemania)	1 tableta/10 ml

Solución de lisis de tripomastigotes

EDTA	1 mM
Triton X100	0,1% v/v
NP40 (detergente no iónico)	0,1% v/v
NaCl	100 mM
PMSF (inhibidor de proteasas)	25 mM

3.2. Selección de pacientes y toma de muestras.

La selección de pacientes con enfermedad de Chagas crónica y toma de muestras fue llevada a cabo en el Servicio de Cardiología del Hospital General de Agudos “Dr. Ramos Mejía”, el Instituto Nacional de Parasitología (INP-ANLIS) “Dr. Mario Fatale Chabén” y el Hospital General de Agudos “Dr. Ignacio Pirovano”. Todos los protocolos empleados siguen los lineamientos de la Declaración de Helsinki y de los Comités de Ética Médica de los respectivos centros de muestreo. En concordancia con esto, todos los pacientes incluidos dieron consentimiento informado por escrito, previo a la extracción de la muestra y luego de que la naturaleza de la investigación les fuera explicada.

Las muestras consistieron en 35 a 100 ml de sangre venosa periférica, recolectada en tubos anticoagulados con EDTA. Se tuvieron como criterios de inclusión de pacientes serología positiva para enfermedad de Chagas, determinada por al menos dos métodos independientes (ELISA, IFI o HAI) y

lugar de residencia dentro del gran Buenos Aires (por fuera de la zona endémica de la enfermedad). Los criterios de exclusión fueron hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus, disfunción tiroidea, insuficiencia renal, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, desórdenes hidroelectrolíticos, alcoholismo, historial médico sugiriendo obstrucción coronaria arterial y enfermedad reumática, embarazo, imposibilidad de completar los exámenes clínicos necesarios. Todos los pacientes incluidos fueron sometidos a examinación clínica y cardiológica completa, incluyendo, a discreción de los médicos a cargo, evaluación de historia clínica, examinación física, electrocardiograma en reposo, exámenes de laboratorio de análisis clínico, radiografía de tórax, ecocardiografía Doppler.

Adicionalmente, se tomaron muestras de individuos no infectados por *T. cruzi* como grupo control, utilizando (a excepción de la serología) los mismos criterios de inclusión y exclusión.

3.3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Luego de la extracción, se obtuvieron las células mononucleares (CMN) a partir de sangre periférica anticoagulada, por el método de centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia), de acuerdo con las instrucciones provistas por el fabricante. El procesamiento de las muestras se comenzó dentro de las 4 h posteriores a la extracción. Las células obtenidas fueron resuspendidas en medio de ensayo y utilizadas para el correspondiente experimento, o resuspendidas en suero fetal bovino (SFB, Natocor, Córdoba, Argentina) suplementado con 10% dimetilsulfóxido (DMSO) y criopreservadas en N₂ líquido.

3.4. Lisado de parásitos.

3.4.1. Epimastigotes.

Uno a 2 litros de cultivo en medio LIT axénico de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial de epimastigotes (cepa CL Brener) se centrifugaron a 400 g por 10 min en tubos cónicos de 50 ml. Luego de descartar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en PBS y se centrifugó nuevamente para lavar el medio de cultivo excedente. El sedimento resultante fue resuspendido en solución de lisis de epimastigotes, siguiendo la relación 0,5 ml de solución de lisis por cada 10⁹ parásitos, y sometido a 5 ciclos de congelado en N₂ líquido y descongelado a temperatura ambiente. Las proteínas totales se

cuantificaron por el método de Bradford, obteniéndose valores de concentración 14,4 a 22,7 mg/ml. El lisado fue conservado a -80 °C. Para los ensayos de cultivo celular, se esterilizó por filtrado a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,2 µm de diámetro de poro, luego de llevarse a concentración de 1 mg/ml con PBS.

3.4.2. Tripomastigotes/amastigotes.

A partir de cultivos de células C2C12 o VERO en medio RPMI-SFB3 infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* [cepa Sylvio X10, multiplicidad de infección (MOI) 3:1], se recuperaron los sobrenadantes a partir del día 4-6 post infección y se separaron los parásitos (tripomastigotes y amastigotes extracelulares) por centrifugación. Específicamente, se centrifugó a 400 g por 10 min para separar los restos de las células sustrato, se recuperó el sobrenadante y finalmente se centrifugó a 2.000 g por 10 min para sedimentar los parásitos. El sedimento resultante se lavó con 1 ml de PBS y se contaron los parásitos en cámara de Neubauer. Seguidamente se centrifugó a 2.000 g por 10 min y se descartó el sobrenadante. Se almacenaron los sedimentos a -20 °C hasta acumular una cantidad total de 5×10^8 parásitos totales, para luego resuspenderse en solución de lisis de tripomastigotes, a razón de 50 µl de solución de lisis por cada 10^8 parásitos. La suspensión resultante se sometió a 5 ciclos de congelado en N₂ líquido y descongelado a 37 °C, y 5 ciclos de aspiración/expulsión con jeringa por 30 s cada vez, a través de una aguja de tuberculina (26G). Finalmente, se centrifugó a 1.000 g por 5 min para remover los restos insolubles, y se cuantificó proteínas totales por el método de Bradford, siendo el rendimiento típico entre 0,2 y 0,8 mg de proteína. Según fue necesario, se esterilizó por filtrado a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,2 µm de diámetro de poro.

3.5. Citometría de flujo.

3.5.1. Anticuerpos y equipamiento.

Los anticuerpos y fluorocromos utilizados para citometría de flujo se detallan en la **Tabla 1**.

Los datos fueron adquiridos en un citómetro BD FACSCanto II o en un Miltenyi MACSquant, y analizados mediante el software FlowJo VX (Treestar). En todos los casos, el análisis de las marcaciones se realizó sobre los eventos correspondientes a células individuales, seleccionados en base a los parámetros

de dispersión frontal de luz (área del pico vs. altura del pico, es decir, FSC-A vs. FSC-H).

Tabla 1

Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

Especificidad	Fluorocromo	Isotipo	Clon	Fabricante
CCR7	APC-Cy7	Ratón IgG2a, κ	G043H7	Biolegend (San Diego, EE. UU.)
CD3	FITC	Ratón IgG1, κ	UCHT1	BD Bioscience (San Diego, EE. UU.)
CD3	PE-Cy5	Ratón IgG2a, κ	HIT3a	BD Bioscience (San Diego, EE. UU.)
CD4	PE-Cy7	Ratón IgG2b, κ	OKT4	Biolegend (San Diego, EE. UU.)
CD8	PE-Cy5	Ratón IgG1, κ	RPA-T8	BD Bioscience (San Diego, EE. UU.)
CD19	PE-Cy5	Ratón IgG1, κ	HIB19	BD Bioscience (San Diego, EE. UU.)
CD45RA	APC	Ratón IgG2b, κ	HI100	BD Bioscience (San Diego, EE. UU.)
CD45RO	PE	Ratón IgG2a, κ	UCHL1	BD Bioscience (San Diego, EE. UU.)
IFN-γ	BV421	Ratón IgG1, κ	4S.B3	Biolegend (San Diego, EE. UU.)

3.5.2. Marcación de moléculas de superficie.

Finalizada la estimulación *in vitro*, según se detalle para cada experimento (Resultados), las células fueron transferidas a placas de 96 pocillos fondo V y lavadas por centrifugación (400 g, 10 min) en PBS. El sobrenadante se descartó por inversión rápida de la placa y las células fueron resuspendidas en 25 µl de solución de marcación (dilución de anticuerpo según experimentos de titulación previos en PBS), e incubadas por 20 min a temperatura ambiente, en oscuridad. Luego de esta incubación, se agregaron 100 µl de PBS y se centrifugó (400 g, 10 min), para luego eliminarse el sobrenadante por inversión rápida de la placa. Finalmente, las células marcadas fueron fijadas en solución 1% p/v de paraformaldehído (PFA) en PBS durante 30 min en oscuridad, separadas por centrifugación (400 g, 10 min) y resuspendidas en 200 µl de PBS. Estas muestras fueron conservadas a 4 °C en oscuridad hasta el momento del análisis citométrico.

3.5.3. Marcación intracitoplasmática de citoquinas.

Con el fin de caracterizar las poblaciones celulares activadas, se realizaron experimentos de estimulación *in vitro* de CMN (densidad $1,0-2,5 \times 10^5$ células/ml), con una incubación total de 18 h y agregándose Brefeldina A 5 µg/ml y Monensina 2 µM durante las últimas 4 h.

Finalizada la incubación, se realizó la marcación de moléculas de superficie (ver **3.5.2 Marcación de moléculas de superficie.**), fijando con

Fixation Buffer (Biolegend, San Diego, EE. UU.) en lugar de solución de PFA 1% v/v. Luego de la fijación, las células fueron centrifugadas, se retiró el sobrenadante por pipeteo suave y se lavaron 2 veces por resuspensión en 50 μ l de Intracellular Staining Permeabilization/Wash Buffer (en adelante “ISPWB”, BioLegend, San Diego, EE. UU.), centrifugación (400 g, 10 min) y aspiración del sobrenadante. Seguidamente, se resuspendieron en 20 μ l de solución de anticuerpo BV421 anti-IFN- γ en ISPWB y se incubaron en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente, en oscuridad. El excedente de anticuerpo fue removido mediante dos lavados sucesivos, similares a los ya descritos, con 150 μ l de ISPWB. Finalmente, las células marcadas fueron fijadas por 20 min a temperatura ambiente con 75 μ l de Fixation Buffer, para luego lavarse 1 vez con PBS y resuspenderse en un volumen final de 50 μ l de PBS. Las células marcadas fueron mantenidas a 4 °C en oscuridad hasta el momento del análisis citométrico.

3.6. Generación de líneas de linfocitos B inmortalizados.

Para determinados pacientes, según se indica en Resultados, se generaron líneas celulares de linfoblastoma B (B-LCL) autólogas, siguiendo una versión adaptada del protocolo descrito por Lan *et al.* (2007). A partir de sobrenadantes de cultivo de la línea celular B95-8 (<https://www.atcc.org/Products/All/VR-1492.aspx>) se preparó una suspensión de virus Epstein-Barr (EBV, por sus siglas en inglés), por centrifugación a 300 g, 4 °C, por 10 min, seguida de filtración a través de membrana de acetato de celulosa (diámetro de poro 45 μ m). Las suspensiones virales se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

Para la inmortalización de linfocitos B, 10^7 CMN se incubaron con 1,25 ml de suspensión de EBV, en un volumen final de 5 ml de medio RPMI-SFB, por 2 h a 37 °C. Finalizado este tiempo, se agregaron 5 ml del mismo medio suplementado con ciclosporina A 2 μ g/ml (1 μ g/ml concentración final; Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) y se continuó la incubación en estufa (37 °C, 5% CO₂, humedad controlada) por 3 semanas. Durante este período se evaluó la formación de aparición de linfocitos de tamaño mayor al usual, formando agregados celulares, como criterio de éxito del proceso. Las líneas B-LCL obtenidas fueron caracterizadas por citometría de flujo (*Figura 10*), utilizando anticuerpos PE-Cy5 anti-CD19 y FITC anti-CD3 (ver Tabla 2, en), tomándose

como punto de corte un porcentaje no menor a 90% de linfocitos CD3⁺CD19⁺ en la muestra para dar por finalizada la inmortalización.

La expansión de las líneas se realizó en botellas de cultivo T25 o T75, realizándose recuentos dos veces por semana y ajustando la densidad celular a $0,5-1 \times 10^6$ células/ml. Para su criopreservación en N₂ líquido, las células fueron lavadas por centrifugación en PBS y resuspendidas en SFB con 10% DMSO.

Para pre-cargar las B-LCL con antígeno, previo a su utilización como CPA en ensayos de evaluación de especificidad, las células se incubaron por 3 o 18 h, según se indique, en medio RPMI-SFB conteniendo 10 µg/ml de lisado de epimastigote. Finalizada la incubación, se lavaron por centrifugación en PBS (400 g, 10 min), se resuspendieron en medio RPMI-SH (medio utilizado para los ensayos de desafío) y se irradiaron con 10⁴ rad (radiación β). El resto de los pasos de este tipo de ensayo se explica más adelante, en Ensayo de evaluación de la especificidad de cultivos de linfocitos T.

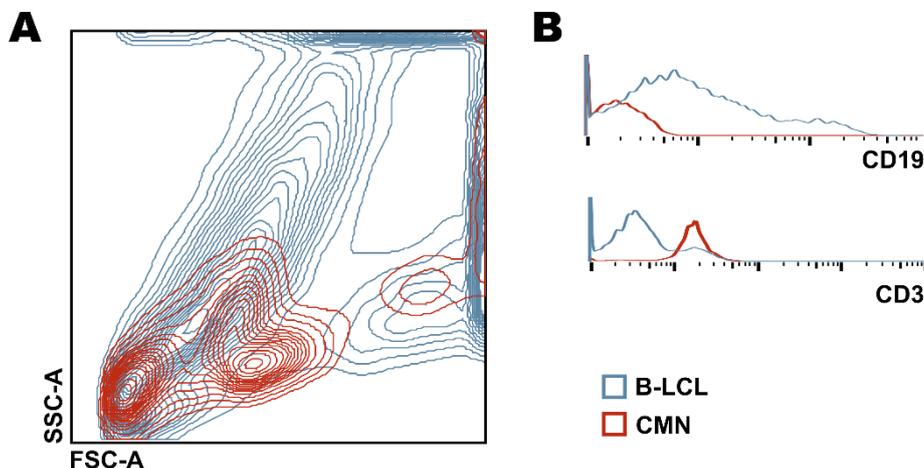
3.7. Estimulación y cultivo de linfocitos T.

3.7.1. Estimulación inicial de CMN y mantenimiento de cultivos de linfocitos T.

CMN recién aisladas o recién descongeladas fueron sembradas en placas de 96 pocillos fondo U e incubadas, en medio RPMI-SH, con 2,5 µg/ml de lisado de epimastigotes de *T. cruzi*. El tiempo de co-incubación con el antígeno, la densidad de células/pocillo y el número de pocillos sembrados fueron variables ajustadas en el transcurso de este trabajo. Como control del estado

Figura 10

Cambios morfológicos (A) y de expresión de moléculas de superficie (B) observados al final del proceso de la generación de líneas de B-LCL respecto de las CMN de partida. Se muestra un caso representativo. FSC-A: área del pico de dispersión frontal de luz; SSC-A: área del pico de dispersión lateral de luz.



fisiológico de las CMN al inicio del protocolo, se realizó una estimulación inespecífica con fitohemaglutinina (PHA, Sigma, St. Louis, EE. UU.) 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La presencia de signos de activación celular (aumento del número de células y aparición de acúmulos) fueron evaluados por microscopía óptica. Asimismo, se sembró en cada caso algunos pocillos CMN sin estímulo como condición de control negativo de la estimulación, no observándose dichos signos de activación. A partir de un determinado tiempo (ver en particular para cada experimento), los cultivos se mantuvieron con el agregado periódico de interleuquina-2 (IL-2) cada 3-4 días y el recambio del medio de cultivo por medio fresco según necesidad (típicamente cada 1-2 semanas).

3.7.2. Expansión con PHA.

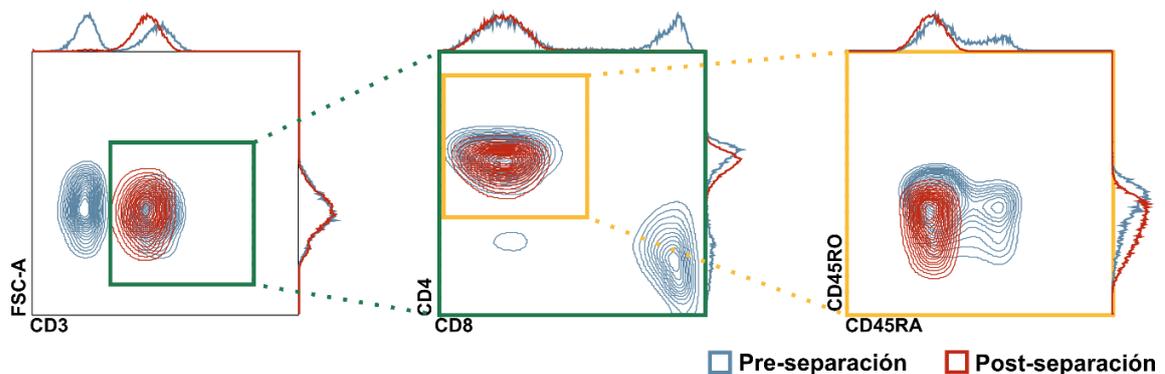
Con el fin de lograr una expansión rápida de los linfocitos T, se realizaron expansiones no antígeno específicas, utilizando el mitógeno PHA a una concentración de 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, junto con 50 UI/ml de IL-2 y $2,5 \times 10^4$ CMN irradiadas (radiación β , 4.000 rads) de 3 donantes no relacionados y no infectados con *T. cruzi*, como estímulo. A modo de control, se prepararon 8 a 48 pocillos de las mismas placas utilizadas para la expansión en las mismas condiciones, sin linfocitos T, evidenciándose la no expansión de las células alogénicas irradiadas.

3.7.3. Separación de linfocitos T CD4⁺ de memoria.

A partir de CMN, se aisló la población de linfocitos T CD4⁺ de memoria por medio del kit de selección inmunomagnética negativa EasySep Human Memory CD4⁺ T Cell Enrichment Kit y el imán de separación EasySep Purple

Figura 11

Análisis citométrico de la separación inmunomagnética de linfocitos T CD4⁺ de memoria a partir de CMN. Los resultados representativos mostrados corresponden a un único paciente. El primer panel muestra los eventos dentro del *gate* de linfocitos (FSC-A vs. SSC-A)/células individuales (FSC-A vs. FSC-H). Los demás pasos de selección de poblaciones se ilustran en la Figura.



Magnet (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. Brevemente, CMN recién descongeladas en medio RPMI-SH se lavaron por centrifugación en PBS (400 g, 10 min) y se llevaron a una densidad de 5×10^7 células/ml en medio de separación inmunomagnética, y se incubaron por 10 min con el cóctel de anticuerpos (50 μ l/ml de muestra) provistos en el kit. Seguidamente, se agregaron 150 μ l/ml de muestra de suspensión de esferas magnéticas y se incubó por 10 min adicionales, para luego completar un volumen de 2,5 ml con medio de separación inmunomagnética e incubar nuevamente por 5 min en el interior del imán. Finalmente, el imán conteniendo el tubo se invirtió sobre un nuevo tubo cónico estéril, recuperándose los linfocitos T CD4⁺ de memoria separados. Estas células se pasaron a medio RPMI-SH y se contaron en cámara de Neubauer. La población enriquecida se caracterizó por citometría de flujo (ver **3.5.2 Marcación de moléculas de superficie**), utilizándose los anticuerpos PE-Cy7 anti-CD4, FITC anti-CD3, PE-Cy5 anti-CD8, APC anti-CD45RA y PE anti-CD45RO (ver Tabla 1, en 3.5.1 Anticuerpos y equipamiento). En la Figura 11 se muestra un caso representativo de este análisis, a modo ilustrativo. La recuperación y la pureza medios fueron de $40,9 \pm 14,1\%$ y $93,6 \pm 1,2\%$, respectivamente.

3.7.4. Estimulación inicial de linfocitos T CD4⁺ de memoria.

Las células magnéticamente separadas fueron sembradas en placas de 96 pocillos fondo U, en medio RPMI-SH, a densidad de 5×10^3 células por pocillo y estimuladas con lisado de *T. cruzi* (epimastigotes o tripomastigotes/amastigotes, ver en cada caso) añadiéndose 10^4 CMN autólogas irradiadas como células presentadoras de antígenos (CPA). Alternativamente, 10^3 linfocitos T CD4⁺ de memoria por pocillo se sembraron en placas del mismo formato, y se estimularon con 1 μ g/ml de PHA, 50 UI/ml de IL-2 y 10^4 células alogénicas irradiadas de 3 donantes no infectados con *T. cruzi* y no relacionados. Los cultivos se mantuvieron con el agregado de IL-2 a partir del día 3, cada 3-4 días, a concentración final de 50 UI/ml. La mitad del medio de cada pocillo fue reemplazada por medio RPMI-SH fresco cada 10-14 días (en función de la acidificación producto del metabolismo celular), comenzando el día 15 desde el inicio de los cultivos.

3.7.5. Ensayo de evaluación de la especificidad de cultivos de linfocitos T.

Luego de un determinado tiempo de expansión (ver para cada experimento en particular, en Resultados), la especificidad de cada cultivo de linfocitos T fue evaluada en una alícuota del mismo, que fue transferida a pocillos de una nueva placa de 96 pocillos y cultivada en medio RPMI-SH en presencia o ausencia de lisado de *T. cruzi* (a concentración 2,5 µg/ml, según experimentos de titulación previos), y células presentadoras de antígenos (CMN autólogas irradiadas a 4.000 rads, o B-LCL autólogas irradiadas a 10.000 rads).

Al cabo de 18 h de cultivo, se recolectaron los sobrenadantes para la cuantificación de citoquinas (ver Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivo) y el medio sustraído fue reemplazado por medio RPMI-SH, adicionando 0,5 µCi/pocillo de [³H-metil]-Timidina (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.) e incubando por otras 24 h, para finalmente medir la proliferación como la incorporación de esta marca (ver **3.7.7 Medición de proliferación por incorporación de [³H-metil]-Timidina**).

Para algunos análisis, se normalizaron las respuestas medidas mediante el cociente del valor obtenido en la condición de desafío antigénico sobre el valor de la condición control sin desafiar, para cada parámetro evaluado, obteniéndose un índice de estimulación (IE)

3.7.6. Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivo.

Se empleó el método de ELISA de captura, mediante kits BD optEIA (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.) Para las citoquinas IFN-γ, GM-CSF, TNF-α, IL-6, IL-10 e IL-13 humanas. Para cada una, se insolubilizó el correspondiente anticuerpo de captura en microplacas de 96 pocillos Microlon de alta unión (GBO biosciences, Frickenhausen, Alemania), diluido en solución de carbonato de Sodio según el factor recomendado por el fabricante (50 µl/pocillo), durante una noche, a 4 °C. Finalizada la insolubilización, se descartó la solución de anticuerpo, se lavó 3 veces con solución PBS-Tw, se agregó 100 µl/pocillo de solución de bloqueo de ELISA y se incubó por 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se descartó la solución de bloqueo, se lavó 3 veces con solución PBS-Tw, se agregó 50 µl/pocillo de solución de anticuerpo de captura (según dilución recomendada por el fabricante) en solución de bloqueo de ELISA y se incubó por 1 h. Seguidamente, se lavó 3 veces con solución PBS-Tw, se agregaron los correspondientes sobrenadantes de cultivo, diluidos 1:2 en medio RPMI-SH (25 µl/pocillo de cada

sobrenadante, volumen final: 50 μ l/pocillo) y se incubó durante una noche, a 4 °C. Al cabo de este plazo, se descartaron los sobrenadantes de la placa y se lavó 5 veces con solución PBS-Tw, se agregó la dilución correspondiente de anticuerpo de detección conjugado estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano picante, por sus siglas en inglés horseradish Peroxidase) en solución de bloqueo de ELISA y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se descartó la solución de anticuerpo y conjugado enzimático, se lavó 8 veces a intervalos de 30 segundos con solución PBS-Tw y se procedió al revelado con 50 μ l/pocillo de solución de o-Fenilendiamina (OPD, Sigma Aldrich, EE. UU.) 1,67 mg/ml y H₂O₂ 12,5 \times 10⁻³ % v/v. La reacción colorimétrica se detuvo dentro de los 5-10 min, utilizando H₂SO₄ 1 M, 25 μ l/pocillo. La lectura del ensayo se realizó inmediatamente después, en espectrofotómetro, a 492 nm de longitud de onda.

3.7.7. Medición de proliferación por incorporación de [³H-metil]-Timidina.

Las células pulsadas con timidina tritiada de cada pocillo fueron adsorbidas en filtros de fibra de vidrio clase GF/A (Whatman, Little Chalfont, Inglaterra) utilizando un cosechador CellHarvester 8 (Nunc, Roskilde, Dinamarca), para luego embeberse en líquido de centelleo Optiphase HiSafe 3 (Perkin Elmer, Waltham, EE. UU.). La radiación emitida por la base marcada incorporada se cuantificó en cuentas por minuto (cpm) empleando un contador de centelleo líquido 1214 RackBeta (Wallac-Pharmacia, EE. UU.).

3.7.8. Aislamiento de poblaciones clonales por ensayo de dilución límite.

Con el fin de aislar poblaciones clonales específicas contra antígenos de *T. cruzi*, se realizaron ensayos de dilución límite a partir de cultivos de linfocitos T policlonales detectados como reactivos frente a lisado del parásito. Se preparó una suspensión de la población policlonal a separar de densidad 10⁴ células/ml en medio RPMI-SH, que luego se diluyó 1:10 dos veces sucesivas utilizando el mismo medio de cultivo para llegar a una densidad de 10 células/ml. A partir de la suspensión resultante, se realizaron 1, 2 y 3 diluciones 1:3 sucesivas de manera de alcanzar densidades de aproximadamente 30, 10, y 3 células/ml, respectivamente. De las suspensiones de 100, 30, 10 y 3 células/ml, se sembraron 100 μ l/pocillo, es decir, a razón de 10, 3, 1 o 0,3 células/pocillo en 5 placas de 96 pocillos fondo U (480 pocillos por cada condición de densidad celular). Seguidamente, se agregaron 100 μ l/pocillo de medio RPMI-SH conteniendo células alogénicas irradiadas (10.000 rads) de tres donantes no relacionados, no infectados con *T. cruzi* (4 \times 10⁵ células/pocillo), IL-2 (25 UI/ml)

y PHA (0,5 µg/ml), de manera similar a lo descrito en Expansión con PHA. Del mismo modo, se prepararon 5 placas control sin linfocitos T, de manera de controlar la no expansión de las células irradiadas.

Tres días después del inicio del protocolo, la mitad del medio de cultivo se retiró por pipeteo suave y se reemplazó por medio fresco conteniendo IL-2 25 UI/ml. A partir de este momento, se agregó IL-2 cada 3-4 días para mantener los cultivos, y al día 10 se comenzó el monitoreo del crecimiento de las células en cultivo, de manera de detectar aquellos pocillos con expansión de células viables. Al día 14, todos los cultivos provenientes de las condiciones de 0,3, 1 y 3 células/pocillo y aquellos en los que se observó crecimiento celular de la condición de 10 células/pocillo, se estimularon con PHA (ver Expansión con PHA). A partir de este momento, este tipo de estimulación se realizó de manera periódica cada 14-21 días, alternándose con evaluaciones de especificidad (ver Ensayo de evaluación de la especificidad de cultivos de linfocitos T.), según se detalla en la sección de Resultados.

3.7.9. Perfil de expresión de TCR-Vβ.

El repertorio de cadena Vβ del receptor de célula T (TCR-Vβ) se analizó por citometría de flujo utilizando el kit comercial IOTest Beta Mark (Beckman-Coulter, EE. UU.). Este método emplea 8 mezclas de a 3 anticuerpos específicos contra distintas familias de TCR-Vβ, marcados con FITC, PE-Cy5 o ambos fluorocromos cada uno, de modo tal que permite distinguir la frecuencia de células que expresan cada familia de dicha molécula. Se marcaron 5×10^5 células por mezcla de anticuerpo siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.8. Predicción de epítopes T de *Trypanosoma cruzi*.

3.8.1. Bases de datos y secuencias.

Para la predicción de epítopes se utilizaron las secuencias de *T. cruzi* anotadas como antígenos en la Base de Datos de Inmunoepítopes (IEDB, <http://www.iedb.org>). Al momento de la búsqueda, 53 proteínas cumplían con este criterio. Para el análisis de conservación entre cepas de *T. cruzi* se utilizaron secuencias de las cepas del parásito cuyo genoma fue completamente secuenciado y anotado en la base de datos TriTryp (<http://www.tritrypdb.org>), Sylvio X10 y CL Brener.

Las secuencias de *Homo sapiens* utilizadas para tamizar las secuencias de *T. cruzi* fueron obtenidas a partir del repositorio de la Universidad de California en San Diego.

3.8.2. Software y selección de péptidos candidatos.

Para la predicción de inmunogenicidad de decapeptímeros se emplearon los algoritmos MHCpan (predicción de afinidad teórica de los nona- y decámeros únicos por las moléculas de CMH clase I, Hoof *et al.*, 2009; Nielsen y Andreatta, 2016) y MHCIIpan (predicción de afinidad teórica de los nona- y decámeros únicos por las moléculas de CMH clase II, Karosiene *et al.*, 2013). Los alelos para los cuales se realizaron las predicciones fueron, en el caso de CMH clase I, los alelos de los genes HLA-A y -B más frecuentes en Latinoamérica. En el caso de las moléculas de CMH clase II, se utilizaron los alelos de HLA-DR más frecuentes en la población humana mundial. La lista completa de estos alelos se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2

Alelos de HLA utilizados para la predicción bioinformática de epitopes de clases I y II.

HLA-A (10)	HLA-B (25)	HLA-DR (11)
A*01:01	B*07:02 B*39:03	DRB1*01:01
A*02:01	B*08:01 B*39:05	DRB1*03:01
A*02:04	B*15:01 B*39:06	DRB1*04:01
A*02:11	B*15:04 B*39:09	DRB1*07:01
A*02:19	B*15:07 B*40:02	DRB1*08:02
A*24:02	B*27:05 B*40:04	DRB1*09:01
A*24:03	B*35:01 B*48:01	DRB1*11:01
A*26:01	B*35:04 B*48:03	DRB1*13:02
A*31:01	B*35:05 B*51:01	DRB1*14:02
A*68:01	B*35:11 B*51:04	DRB1*15:01
	B*35:18 B*52:01	DRB1*16:01
	B*35:19 B*58:01	
	B*39:01	

Se utilizó el algoritmo PopCover (Lundegaard y Perez, 2010) para jerarquizar la lista de secuencias obtenidas en función de la predicción anterior y del número de variantes polimórficas de HLA para el cuál tendrían capacidad de unión. Este paso optimiza la probabilidad de obtener una respuesta positiva y la cobertura de alelos HLA en la población de estudio.

A partir de estos resultados, se filtraron las secuencias redundantes y aquellos 15-meros solapados en 14 aminoácidos fueron combinados en un único hexadecámero (16-mer). Finalmente, en función del procedimiento completo, se seleccionaron las 50 mejores secuencias y se encomendó la síntesis de los péptidos correspondientes a un proveedor comercial (GenScript Biotech, China).

3.9. Ensayo de ELISPOT.

El ensayo de inmunospot ligado a enzima (ELISPOT, del inglés Enzyme-linked immunospot) permite la detección de células productoras de diversas moléculas, entre ellas citoquinas, que se encuentran en baja frecuencia. La base inmunoquímica del método es la misma que la del ensayo de ELISA, difiriendo en el método de detección.

Sobre placas de cultivo de 96 pocillos con fondo de nitrocelulosa se insolubiliza un anticuerpo específico contra IFN- γ durante 18 h (100 μ l/pocillo en solución de insolubilización de ELISPOT, según la dilución especificada por el fabricante). Luego se lavan una vez con 200 μ l/pocillo de medio de cultivo RPMI-SFB y se someten a 2 h de bloqueo con 200 μ l/pocillo del mismo medio. Sobre esta superficie, las células a ensayar se incuban con el estímulo [lisado de *T. cruzi* 10,0 μ g/ml, PHA 5,0 μ g/ml, mezcla de péptidos 10,0 μ g/ml (1,0 μ g/ml de cada péptido en la mezcla) o péptido individual 10,0 μ g/ml] durante 18 h. Por estar los péptidos y mezclas de péptidos disueltos en DMSO, se incorporó en las condiciones sin péptidos el volumen equivalente de este solvente, para homogeneizar la contribución de su presencia sobre la señal detectada.

Finalizada la incubación, las células se eliminan por lavados sucesivos (200 μ l/pocillo): uno con agua desionizada y tres con PBS-Tw a intervalos de 5 min. En el paso siguiente, los pocillos se incuban con solución de anticuerpo anti-IFN- γ (100 μ l/pocillo, según la dilución indicada por el fabricante, en solución de bloqueo de ELISA) durante 2 h.

Finalizado este período, los pocillos se lavan 3 veces con PBS-Tw (200 μ l/pocillo) y se agrega una dilución de conjugado estreptavidina-peroxidasa (100 μ l/pocillo, según dilución indicada por el fabricante en solución de bloqueo de ELISA) durante 1 h.

Finalmente, los pocillos se lavan (200 μ l/pocillo) 4 veces con PBS-Tw a intervalos de 2 min y 2 veces con PBS, para luego revelarse con solución de

revelado de ELISPOT AEC (100 μ l/pocillo, 1 gota de cromógeno por cada ml de sustrato). La placa se monitorea observándose la aparición de spots sobre la membrana y el revelado se detiene (usualmente al cabo de entre 10 y 15 min) por lavado con abundante agua desionizada.

Cada célula secretora de la citoquina produce un punto (“*spot*”) de color a nivel local, en la posición sobre la membrana de nitrocelulosa en la que se encontraba durante la incubación. El recuento de estos *spots* se realiza de forma semi-automatizada, empleando un analizador CTL ImmunoSpot Analyzer S6 (CTL, Ohio, EE. UU.), y el valor obtenido se denomina unidades formadoras de *spots* (UFS). Para algunos análisis, la respuesta frente a cada estímulo se normalizó dividiéndose por las UFS obtenidas en la condición de control sin estímulo, obteniéndose un índice de estimulación (IE)

3.9.1. Sustracción magnética de poblaciones celulares

Para los ensayos de ELISPOT sobre CMN con sustracción de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ se utilizó el método de separación magnética de poblaciones, utilizando los kits de selección positiva EasySep Human CD4 Positive Selection Kit y Human CD8 Positive Selection Kit y el imán de separación EasySep Purple Magnet (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá), siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. El protocolo seguido fue similar al descrito para Separación de linfocitos T CD4⁺ de memoria., pero duplicando el tiempo de incubación del tubo dentro del imán (de 5 min se llevó a 10 min), según la recomendación del fabricante para el uso de kits de selección positiva para eliminación de la población seleccionada.

El resultado de la separación se corroboró mediante citometría de flujo, utilizando anticuerpos FITC anti-CD3, PE-Cy7 anti-CD4 y PE-Cy5 anti-CD8 (ver Anticuerpos y equipamiento). En la **Figura 12A, B** se ilustra el resultado para un caso representativo. Utilizando esta información, se estimó la frecuencia remanente de la población en cada caso. Para ello, se tomó como supuesto la no variación de la cantidad de células de la población no eliminada y se calculó en función de ella la frecuencia esperada de la población eliminada, y finalmente a partir de esta el porcentaje remanente. Este procedimiento se ilustra en el esquema de la **Figura 12C**. Los porcentajes de eliminación de las poblaciones específicas alcanzados fueron de 81,4% \pm 14,9% en el caso de los linfocitos T CD4⁺, y de 98,1% \pm 0,3% para los CD8⁺.

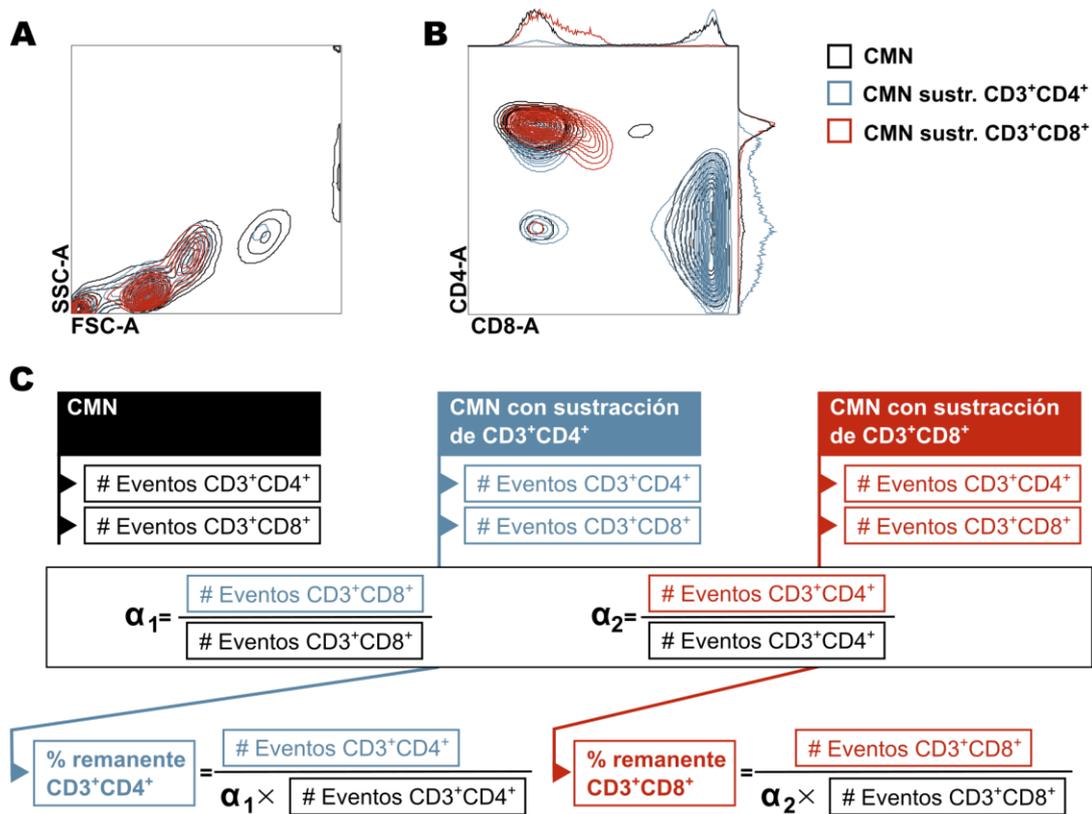


Figura 12

Información citométrica de las muestras utilizadas para experimentos de ELISPOT con sustracción de poblaciones celulares. **A.** Ausencia de cambios morfológicos notables en las poblaciones celulares luego del procedimiento de sustracción de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺. **B.** Cambio en la representación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ [gating en linfocitos (SSC-A vs. FSC-A) / CD3⁺]. Los paneles **A** y **B** muestran un caso representativo. **C.** Estrategia empleada para calcular estimativamente el porcentaje remanente de las poblaciones depletadas (CD3⁺CD4⁺ o CD3⁺CD8⁺). La relación entre el número de eventos CD8⁺ (para el caso de la eliminación de CD4⁺) o CD4⁺ (para la eliminación de CD8⁺) respecto de los mismos valores en la muestra sin separar (CMN) permite calcular un factor de escalado (α) que sirve para estimar cuál hubiera sido el número esperable de eventos CD4⁺ o CD8⁺ en la muestra, si esa población no hubiera sido eliminada, y así obtener el valor buscado.

3.10. Análisis estadístico.

Se utilizaron el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, EE. UU.) y paquetes de código abierto de lenguaje R para aplicar las pruebas estadísticas pertinentes a cada caso, según se indica en Resultados.

4. Expansión y detección *ex vivo* de linfocitos T de memoria específicos contra *T. cruzi* de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

4.1. Optimización del protocolo de estimulación y cultivo de linfocitos T a partir de células mononucleares de sangre periférica.

Con el fin de expandir las poblaciones de linfocitos T específicas contra *T. cruzi* a partir de las CMN de pacientes con enfermedad de Chagas, se evaluaron diferentes condiciones de estimulación y cultivo celular. En líneas generales, los protocolos consistieron en una estimulación inicial con lisado de *T. cruzi* para amplificar selectivamente las células de interés, y subsecuentes expansiones con PHA, IL-2 y células alogeneicas irradiadas de tres donantes no infectados con el parásito y no relacionados con el donante de las células a expandir. Al final de cada protocolo, se evaluó la especificidad de los cultivos primarios generados con el fin de encontrar las mejores condiciones para obtener líneas de linfocitos T específicas contra antígenos del parásito. En la **Figura 13** se muestra una representación esquemática de los protocolos de estimulación, expansión y desafío.

Las variables a ajustar para la optimización de protocolos fueron:

- la duración del estímulo inicial;

- la densidad inicial de células/pocillo;
- el número de expansiones con PHA.

Es importante destacar que, aunque idealmente deberían haberse evaluado estas variantes utilizando células de los mismos pacientes, la factibilidad de tal diseño experimental se vio comprometida por la disponibilidad limitada de CMN de cada paciente. A pesar de esta dificultad, los resultados obtenidos permitieron observar tendencias claras y formular conclusiones pertinentes.

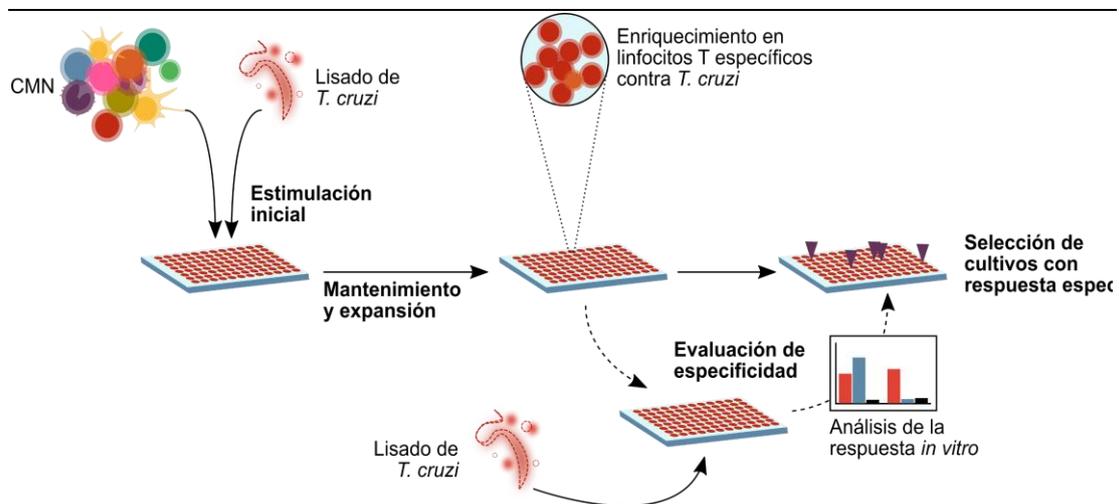


Figura 13

Representación esquemática del protocolo de estimulación y detección de cultivos específicos contra *T. cruzi* a partir de CMN totales.

4.1.1. Efecto de la duración del estímulo inicial en la expansión de linfocitos T específicos contra *T. cruzi*.

Como primera aproximación, se establecieron cultivos de linfocitos T específicos contra el parásito a partir de CMN de dos pacientes con cardiopatía chagásica crónica (RM11, RM14) y un paciente con enfermedad de Chagas crónica asintomática (RM20). Dos sujetos no infectados con *T. cruzi* (FI, MF) fueron incluidos como grupo control. En función de resultados previos de nuestro grupo de trabajo y otros autores (Geiger et al., 2009; Longhi et al., 2014), se decidió primero estudiar la efectividad de una estimulación inicial de 6 días con lisado del parásito para expandir selectivamente las células con especificidad por esos antígenos. Con posterioridad al estímulo, las células fueron sometidas a dos expansiones con PHA para luego medir su capacidad de

respuesta específica frente al parásito mediante un experimento de desafío, en el que la misma se evaluó como secreción de IFN- γ o proliferación celular. Un esquema de línea de tiempo se muestra en la **Figura 14A**, a modo de ilustración del protocolo ensayado.

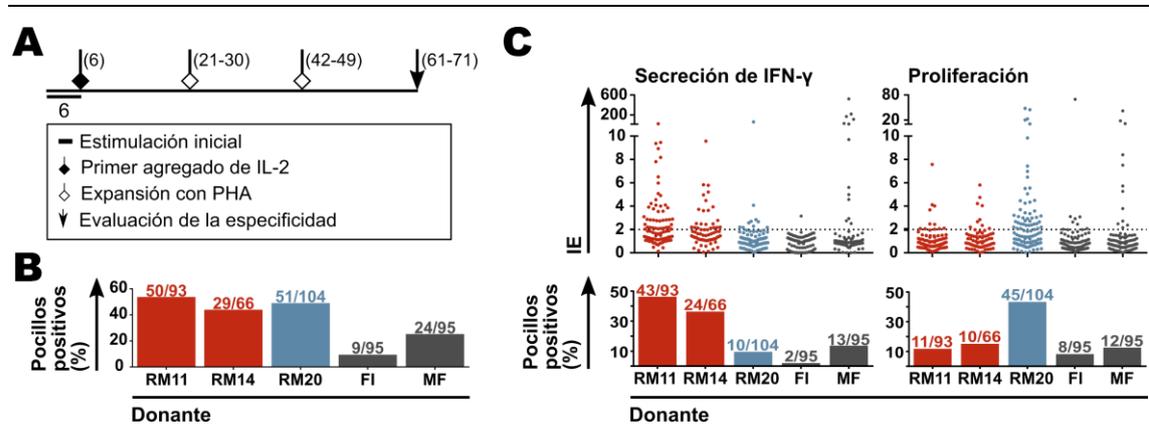


Figura 14

Efecto del tiempo inicial de estimulación sobre la respuesta *in vitro* de los linfocitos T frente al lisado de *T. cruzi*. Las CMN fueron estimuladas y expandidas, y alícuotas de $1,0-2,0 \times 10^4$ linfocitos T de estos cultivos fueron desafiados con antígenos del parásito, usando $2,0-4,0 \times 10^4$ CMN autólogas irradiadas como CPA. La respuesta se midió por secreción de IFN- γ y proliferación. Se consideraron como positivos los cultivos con índice de estimulación (IE) ≥ 2 . Los gráficos de puntos muestran valores de IE de cultivos individuales. Las barras representan porcentaje de cultivos positivos sobre el total de cultivos analizados para cada donante. El número de cultivos positivos vs totales se indica en los números sobre las barras. Los colores indican a qué grupo corresponde cada donante: rojo: pacientes con cardiopatía chagásica crónica; azul: pacientes con enfermedad de Chagas asintomática; gris: sujetos no infectados. **A.** Esquema de línea de tiempo de los protocolos de estimulación y desafío. Los números entre paréntesis junto a los símbolos representan el día (o rango de días, en los casos en los que se incorporaron leves variaciones a causa de diferencias en las velocidades de crecimiento celular) en que se llevó a cabo cada paso. **B.** Porcentaje de cultivos que resultaron positivos por al menos un parámetro en cada sujeto. **C.** Respuesta de cultivos individuales (gráfico de puntos) y porcentaje de cultivos positivos (barras) segregado por parámetro.

Tabla 3

Comparación estadística entre la respuesta observada por secreción de IFN- γ , proliferación o ambas, en pacientes con enfermedad de Chagas crónica vs sujetos no infectados con *T. cruzi*. Los números corresponden a los *p*-valores de test exacto de Fisher con corrección de Bonferroni-Holm para comparaciones múltiples, aplicado sobre el porcentaje de cultivos positivos. Los datos de los individuos no infectados fueron combinados de manera de permitir el contraste contra cada paciente. Se consideró como estadísticamente significativo $p < 0,05$.

Paciente	Secreción de IFN- γ	Proliferación	Al menos uno de los parámetros
RM11	<0,0001	0,443	<0,0001
RM14	<0,0001	0,427	<0,0001
RM20	0,381	<0,0001	<0,0001

Como se muestra en los gráficos de la **Figura 14B, C**, los cultivos de pacientes infectados mostraron 43,9-53,8% de pocillos positivos por al menos uno de los dos parámetros evaluados, indicando la expansión de linfocitos T específicos contra el parásito. Bajo las mismas condiciones, se detectaron pocillos positivos en el rango del 9,6-25,3% del total de los sembrados entre los cultivos de individuos no infectados. Sin embargo, como se muestra en la **Tabla 3**, la diferencia entre los pacientes con enfermedad de Chagas y los individuos control fue estadísticamente significativa (test exacto de Fisher con corrección de Bonferroni-Holm, $p < 0,05$).

Asimismo, con el fin de comparar la respuesta observada por cada método de detección en respuesta al lisado de *T. cruzi* con la respuesta basal en la condición sin estímulo, pero analizando todos los cultivos de cada donante como conjunto, se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras apareadas sobre los valores de cpm y de pg/ml de citoquina de los mismos experimentos. Se observó que los cultivos de todos los pacientes con enfermedad de Chagas mostraron respuesta significativamente mayor en la condición de desafío con el lisado respecto del nivel basal. Por el contrario, los individuos no infectados no evidenciaron diferencia significativa, o lo hicieron en sentido inverso, es decir inhibición de la respuesta respecto de la condición basal. Estos resultados se ilustran en la **Figura 15**.

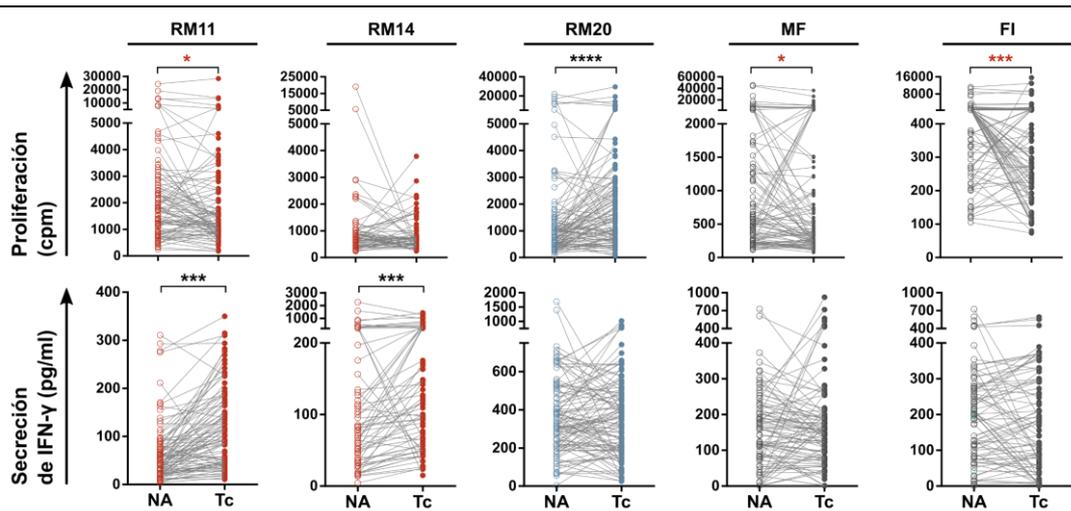


Figura 15

Secreción de IFN- γ (pg/ml) y proliferación (cpm) en condición de estimulación con lisado de *T. cruzi* (Tc), o sin estimular (NA). Los resultados fueron analizados por el test estadístico de rango signado de Wilcoxon (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$). Los asteriscos negros indican significatividad estadística en los casos en los que la respuesta frente al lisado fue mayor que en la condición sin desafiar ($W > 0$). Los asteriscos rojos indican la significatividad estadística en los casos en los que la respuesta frente al lisado fue menor que en la condición basal ($W < 0$). Los colores de los puntos indican a qué grupo pertenece cada donante: rojo: pacientes con cardiopatía chagásica crónica; azul: pacientes

La respuesta detectada en cultivos de células de individuos no infectados con *T. cruzi* podría estar asociada a la expansión *in vitro* y amplificación de linfocitos T vírgenes. De manera de evaluar si una reducción en el tiempo de estimulación inicial permitiría modular este fenómeno, se llevó a cabo un experimento similar al anterior, pero reduciendo la duración del estímulo con lisado de *T. cruzi* a 2 y 4 d. Se emplearon además muestras de un paciente asintomático y un donante no infectado para poner a prueba ambas condiciones. El protocolo ensayado se muestra en la **Figura 16A**. Los resultados mostraron que una estimulación inicial de 4 días llevó a un mayor porcentaje de pocillos positivos para los cultivos tanto del paciente asintomático (33,3%) como del individuo no infectado (14,6%) en comparación con la condición de 2 días de estimulación (20,8% y 8,3% respectivamente, **Figura 16B**). Llamativamente, la prueba estadística de Wilcoxon mostró una hipotética inhibición de la secreción de IFN- γ para el paciente y una activación de la misma para el sujeto no infectado, en la condición de 2 d. Por otra parte, aplicando el mismo análisis a la condición de 4 d de estimulación, sólo se observó, una respuesta significativa por proliferación para RM24 (**Figura 16C**).

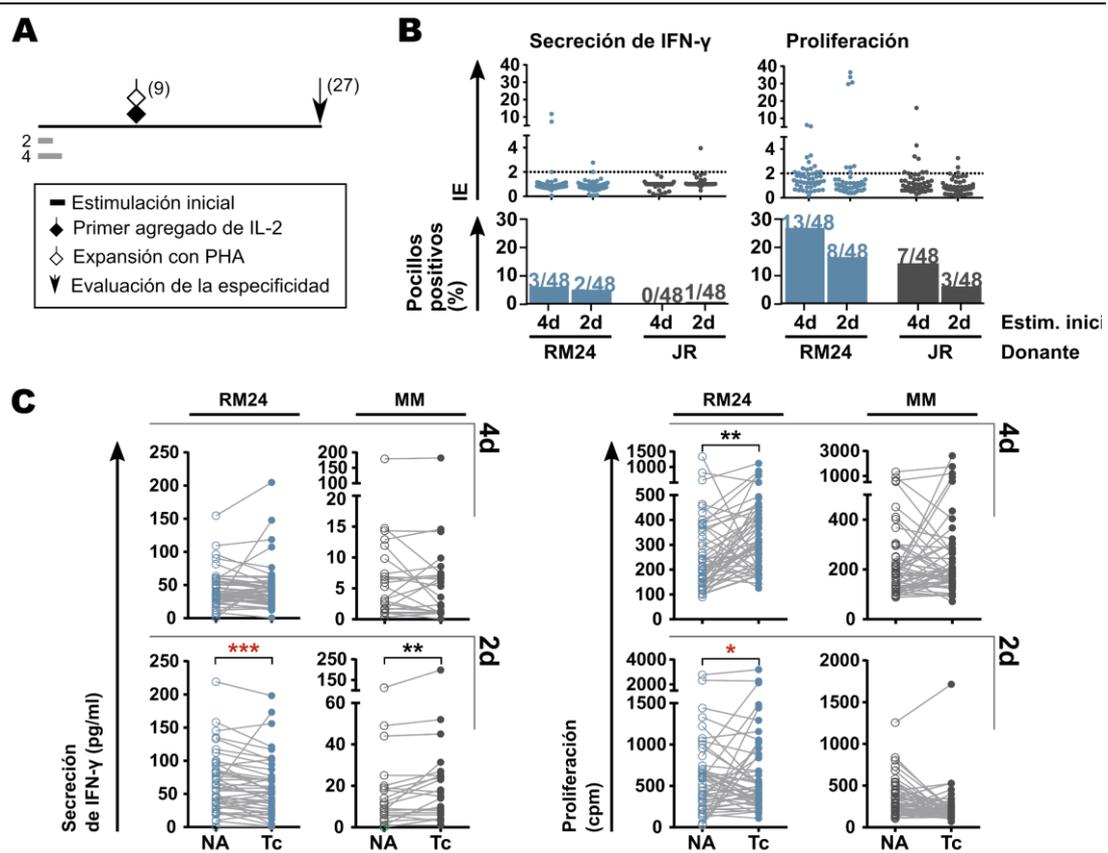


Figura 16

Efecto del tiempo inicial de estimulación sobre la respuesta *in vitro* de los linfocitos T frente al lisado de *T. cruzi*. Las CMN del paciente asintomático RM24 y el sujeto sano JR fueron estimuladas con lisado del parásito por 2 o 4 d y expandidas *in vitro*. Alícuotas de $1,0-2,0 \times 10^4$ linfocitos T de estos cultivos fueron desafiados con antígenos del parásito, usando $2,0-4,0 \times 10^4$ CMN autólogas irradiadas como CPA. La respuesta se midió por secreción de IFN- γ y proliferación. Se consideraron como positivos los cultivos con IE ≥ 2 . **A**. Esquema de línea de tiempo de los protocolos de estimulación y desafío. Los números entre paréntesis junto a los símbolos representan el día en que se llevó a cabo cada paso. **B**. IE (gráficos de puntos) y porcentaje de cultivos que resultaron positivos (barras) para cada parámetro en cada sujeto. El número de cultivos positivos vs totales se indica en los números sobre las barras. **C**. Secreción de IFN- γ (pg/ml) y proliferación (cpm) en condición de estimulación con lisado de *T. cruzi* (Tc), o sin estimular (NA). Los resultados fueron analizados por el test estadístico de rango signado de Wilcoxon (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Los asteriscos negros indican significatividad estadística en los casos en los que la respuesta frente al lisado fue mayor que en la condición sin desafiar ($W > 0$). Los asteriscos rojos indican la significatividad estadística en los casos en los que la respuesta frente al lisado fue menor que en la condición basal ($W < 0$).

En función de lo observado hasta este punto, los siguientes experimentos fueron realizados con una estimulación inicial de 1 día con lisado del parásito. Como se muestra en la **Figura 17**, esta modificación resultó en una reducción aún mayor en el porcentaje de cultivos con respuesta específica para el individuo no infectado MM, sin afectar significativamente el porcentaje de

cultivos reactivos en el paciente RM26 con enfermedad de Chagas crónica asintomática, y el RM25 con cardiopatía chagásica crónica, en comparación con los valores obtenidos para RM24 en el experimento anterior.

En líneas generales, estos resultados indican que tiempos de estimulación menores con lisado de *T. cruzi* conllevan a una menor activación de poblaciones linfocitarias tanto en CMN de individuos no infectados como de pacientes con enfermedad de Chagas crónica, siendo este efecto mucho más marcado en las

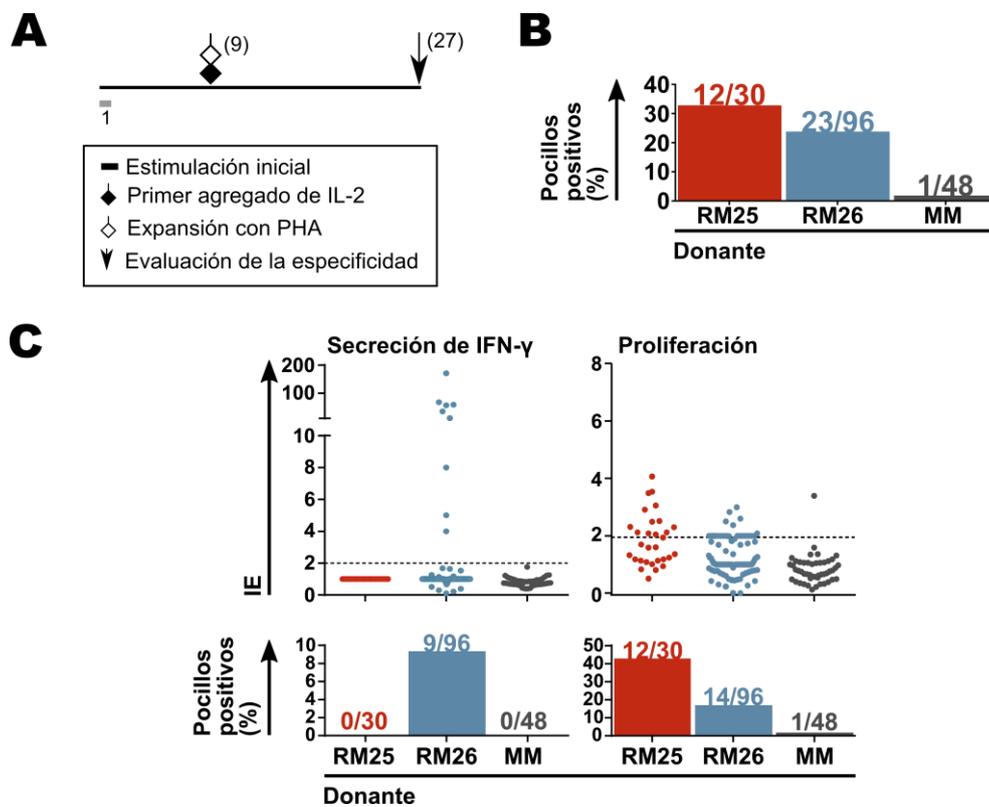


Figura 17

Efecto del tiempo inicial de estimulación sobre la respuesta *in vitro* de los linfocitos T frente al lisado de *T. cruzi*. Las CMN fueron estimuladas con lisado del parásito por 1 día y expandidas *in vitro*. Alícuotas de $1,0-2,0 \times 10^4$ linfocitos T de estos cultivos fueron desafiados con antígenos del parásito, usando $2,0-4,0 \times 10^4$ CMN autólogas irradiadas como CPA. La respuesta fue medida por secreción de IFN- γ y proliferación. Se consideraron como positivos los cultivos con $IE \geq 2$. Las barras representan porcentaje de cultivos positivos sobre el total de cultivos analizados para cada sujeto. El número de cultivos positivos vs totales se indica en los números sobre las barras. **A.** Esquema de línea de tiempo del protocolo de estimulación y desafío. Los números entre paréntesis junto a los símbolos representan el día en que se llevó a cabo cada paso. **B.** Porcentaje de cultivos que resultaron positivos por al menos un parámetro en cada sujeto. **C.** Respuesta de cultivos individuales (gráfico de puntos) y porcentaje de cultivos positivos (barras) segregado por parámetro. En **B** y **C**, Los colores de los puntos y barras indican a qué grupo pertenece cada donante: rojo: pacientes con cardiopatía chagásica crónica; azul: pacientes con enfermedad de Chagas asintomática; gris: sujetos no infectados.

muestras de sujetos no infectados. Esto podría sugerir que estimulaciones iniciales largas favorecen la expansión de linfocitos T vírgenes que se activan *in vitro*, y que no están asociados a la infección con el parásito.

4.1.2. Efecto de las expansiones con PHA en la selección de linfocitos T específicos

La expansión selectiva de linfocitos T específicos que han sido activados *in vivo* a consecuencia de la infección a partir de las CMN totales es un paso crucial en la generación de líneas poli- y monoclonales de linfocitos T patógeno-específicos. Sin embargo, otro paso igualmente crítico de este proceso es la amplificación de estas células a números suficientemente grandes como para permitir su caracterización, por ejemplo, en términos de su especificidad antigénica o de su perfil fenotípico-funcional. Nuestra siguiente meta fue evaluar cómo los ciclos de expansión con PHA (es decir, no antígeno-específica) afectan el enriquecimiento de los cultivos en linfocitos T específicos contra *T. cruzi*, así como la capacidad de los mismos de generar una respuesta detectable que permita su selección. Para ello, se estimularon CMN por 1 día con lisado del parásito y se mantuvieron en cultivo con agregado de IL-2, para luego evaluar la respuesta específica contra el lisado al día 27 (luego de una única expansión con PHA) o al día 47 (luego de 2 expansiones con PHA). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 18**.

En términos de secreción de IFN- γ , sólo se observó respuesta *T. cruzi*-específica en el paciente asintomático RM26. Para este sujeto, el porcentaje de cultivos positivos detectados aumentó luego de la segunda expansión con PHA, aunque los valores globales de índice de estimulación (IE) fueron menores en comparación con los obtenidos luego de una única expansión con PHA (**Figura 18B**). El test estadístico de Wilcoxon para muestras apareadas (**Figura 18C, D**) señaló la activación de secreción de IFN- γ diferencial en respuesta a los antígenos del parásito para el paciente asintomático en ambos desafíos ($p < 0,001$), y sólo en el segundo desafío para el paciente con cardiopatía ($p < 0,01$), en tanto que en el caso del sujeto no infectado la secreción de esta citoquina se vio disminuida en presencia del lisado, respecto de la condición control, en ambos desafíos ($p < 0,001$).

Por otra parte, en cuanto a respuesta proliferativa, se observó un porcentaje menor de pocillos positivos, pero con mayor IE, después de la segunda expansión con PHA para ambos pacientes con enfermedad de Chagas

(Figura 18B). No obstante, para las células del individuo no infectado, los cultivos positivos aumentaron de 2,0% después de 1 expansión a 10,1% después de 2 expansiones con PHA, sugiriendo que varias rondas de estimulación antígeno-inespecíficas podría favorecer la amplificación no deseada de linfocitos T no relacionados con la infección. Al aplicar el test de Wilcoxon a los valores de incorporación de timidina tritiada (Figura 18C, D), se evidenció que la respuesta proliferativa frente al lisado de *T. cruzi* fue significativa sólo para el paciente RM25, luego de la primera estimulación con PHA. Por su parte, el individuo no infectado mostró inhibición de la proliferación ($p < 0,005$) en la misma condición experimental.

Cabe destacar que varios de los cultivos que respondieron en el primer desafío se volvieron negativos para el segundo desafío, y viceversa, tanto para proliferación como para secreción de IFN- γ (Figura 18E). Ningún pocillo pasó de ser positivo para IFN- γ a ser positivo por proliferación, mientras que 5,0% de los pocillos de RM26 pasaron de ser positivos por proliferación a ser positivos por secreción de IFN- γ . De éstos últimos, sólo el 1,0% (calculado sobre el total de pocillos sembrados) se mantuvo positivo para secreción de IFN- γ , al tiempo que ganó respuesta proliferativa. Ninguno de los cultivos del paciente con cardiopatía ni del individuo no infectado mostró este comportamiento.

En conjunto, estos resultados demuestran que expansiones secuenciales con PHA tienen un impacto evidente en la amplificación *in vitro* de linfocitos T específicos contra *T. cruzi*.

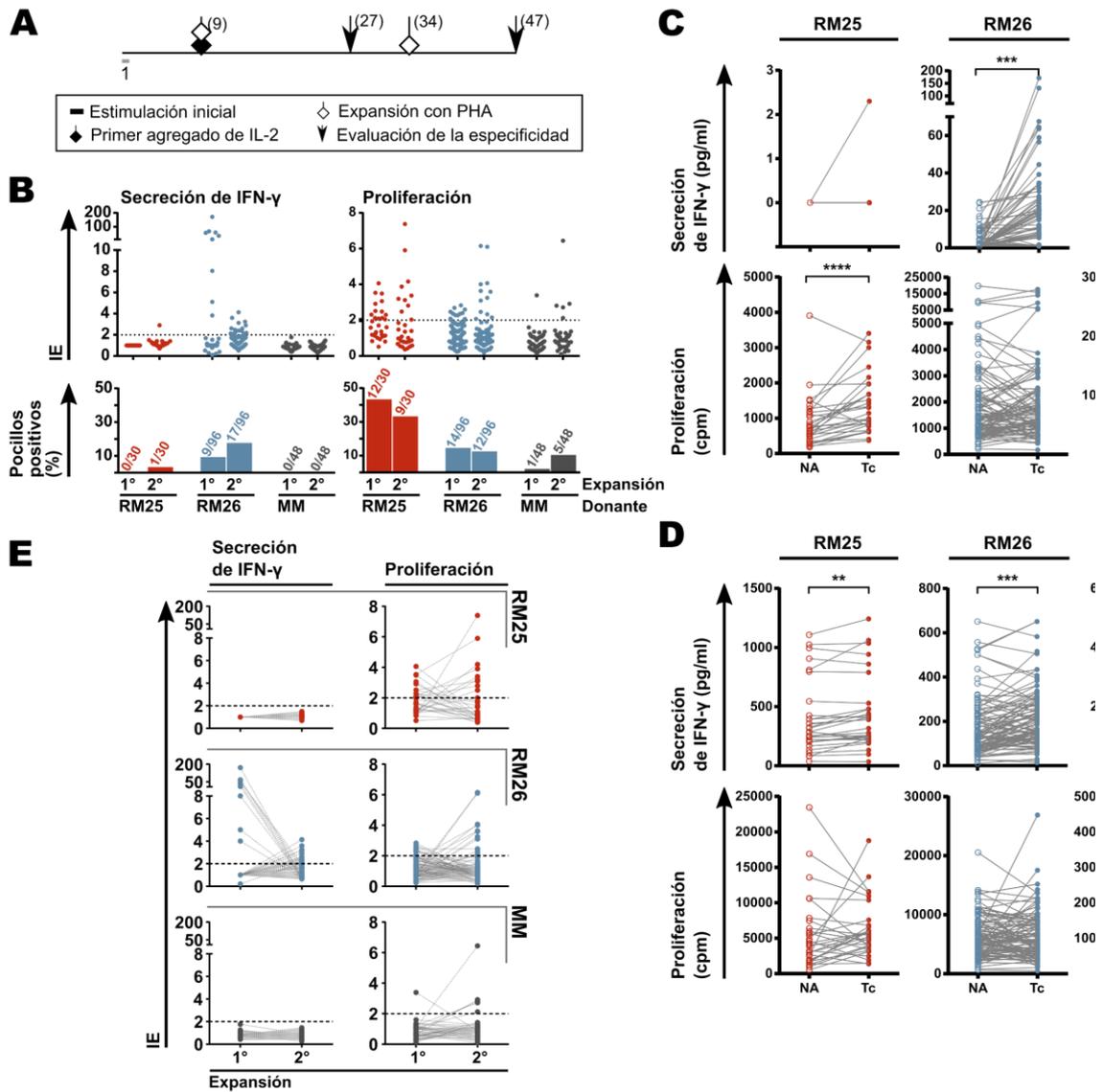


Figura 18

Efecto de las expansiones con PHA sobre la respuesta específica contra *T. cruzi* en cultivos de linfocitos T de un paciente con CCC (RM25), un asintomático (RM26) y un individuo no infectado (MM). Las CMN fueron estimuladas con lisado de *T. cruzi* por 1 día y desafiadas al día 27 luego de una expansión con PHA ("1 $^{\circ}$ expansión") o al día 47 luego de 2 expansiones con PHA ("2 $^{\circ}$ expansión"). Se agregó IL-2 cada 3-4 días desde el día 9. Los colores de los puntos y barras indican a qué grupo pertenece cada donante: rojo: pacientes con cardiopatía chagásica crónica; azul: pacientes con enfermedad de Chagas asintomática; gris: sujetos no infectados. **A**. Esquema de línea de tiempo del protocolo de estimulación y desafío. **B**. Respuesta de cultivos individuales (gráfico de puntos) y porcentaje de cultivos positivos (barras) segregado por parámetro. **C**. Secreción de IFN- γ (pg/ml) y proliferación (cpm) en condición de estimulación con lisado de *T. cruzi* (Tc), o sin estimular (NA), para la evaluación de especificidad después de la primera expansión con PHA. Los resultados fueron analizados por el test estadístico de rango signado de Wilcoxon (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Los asteriscos negros indican significatividad estadística en los casos en los que la respuesta frente al lisado fue mayor que en la condición sin desafiar ($W > 0$). Los asteriscos rojos indican la significatividad estadística en los casos en los que la respuesta frente al lisado fue menor que en la condición basal ($W < 0$). **D**. Ídem **C**, para la evaluación de especificidad posterior a la segunda expansión con PHA. **E**. Representación "antes y después" de la respuesta de cada cultivo individual, por parámetro, en el 1er y 2do desafío.

4.1.3. Utilización de linfocitos B inmortalizados como células presentadoras de antígenos de *T. cruzi* a linfocitos T en cultivo

Dada la disponibilidad limitada de CMN de pacientes, otro factor importante a considerar en el desarrollo de métodos para la generación y detección de linfocitos T antígeno-específicos es qué células serán empleadas como células presentadoras de antígenos (CPA). A pesar de que las células dendríticas, o incluso las CMN son las fuentes típicas de CPA empleadas en este tipo de protocolo, presentan el inconveniente de que su uso extensivo depende de la toma de grandes volúmenes de muestra de paciente. Por el contrario, y a pesar de tener una menor eficacia en la presentación de antígenos, los linfocitos B inmortalizados por infección con el virus Epstein-Barr (también conocidos como líneas celulares linfoides B, o B-LCL por sus siglas en inglés), permiten establecer para cada paciente una fuente sostenible y escalable de CPA autólogas (Purner et al., 1994; Leung et al., 2013).

Con el fin de evaluar la capacidad de las B-LCL para presentar antígenos de *T. cruzi* en experimentos de evaluación de la especificidad, se establecieron cultivos de linfocitos T de pequeña escala, emulándose las condiciones de estimulación y cultivo de los experimentos en la sección anterior (Efecto de las expansiones con PHA en la selección de linfocitos T específicos): CMN de tres pacientes con enfermedad de Chagas asintomática, tres con cardiopatía chagásica crónica y dos individuos no infectados fueron estimuladas con lisado del parásito y mantenidas con el agregado de IL-2 como se indica en la **Figura 19A**, durante 27 días, momento en el cual se las sometió a desafío con el mismo lisado, utilizando CMN o B-LCL autólogas irradiadas como CPA. Para las B-LCL, se ensayaron dos condiciones distintas de pre-carga de las CPA por incubación con el lisado de *T. cruzi* por 3 o 18 h, previo al desafío de los linfocitos T, tal y como se describe en la sección 3.6 (Generación de líneas de linfocitos B inmortalizados.). Vale aclarar que ensayos preliminares en los que no se había pre-cargado con antígenos las B-LCL no permitieron detectar respuesta específica por secreción de IFN- γ ni por proliferación (datos no mostrados).

Como se muestra en la **Figura 19B**, aunque la pre-incubación de las B-LCL con lisado de *T. cruzi* indujo la secreción de IFN- γ en cultivos de linfocitos T de la mayoría de los pacientes estudiados, la utilización de estas líneas celulares como CPA no logró alcanzar los niveles de activación logrados cuando se utilizó CMN como CPA. Sin embargo, la condición de pre-carga de

las B-LCL por 18 h produjo, a diferencia de la condición de 3 h, valores de IE que permiten la detección de una respuesta específica por parte de las células de los pacientes crónicos. Adicionalmente, la intensidad de la respuesta específica fue mayor para los protocolos de estimulación II y III en comparación con el protocolo I, cuando se emplearon B-LCL como CPA en el desafío. Bajo las condiciones ensayadas, no se evidenció respuesta por proliferación frente al desafío.

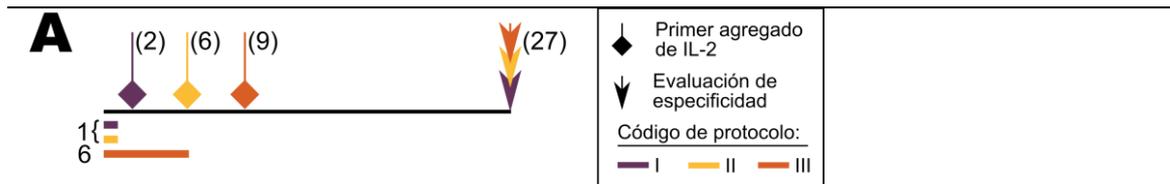
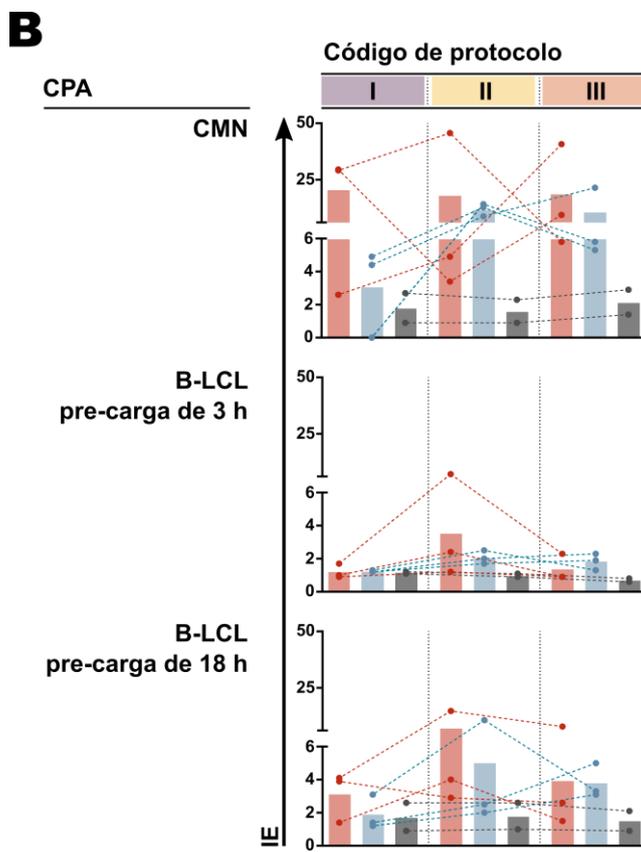


Figura 19



Utilización de linfocitos B autólogos inmortalizados con virus Epstein-Barr como CPA. CMN de 3 pacientes cardíacos, 3 asintomáticos y 2 no infectados fueron sembradas en dos pocillos de placas de 96 pocillos a una densidad de 2×10^5 células/pocillo. Se ensayaron 3 protocolos (I, II y III) de estimulación y desafío. Se agregó IL-2 cada 3-4 días a partir del momento indicado en la figura. Al día 27 post-estimulación, las células de cada condición de cultivo fueron unificadas y 2×10^3 células fueron desafiadas por triplicado contra lisado de *T. cruzi* o medio de cultivo, utilizando CMN autólogas irradiadas, B-LCL autólogas cebadas con antígeno por 3 h, o durante 18 h (4×10^3 CPA/pocillo). **A.** Esquematización de línea de tiempo de los protocolos I, II y III. Los números junto a cada símbolo indican el día desde el inicio del protocolo al que se realizó cada paso. Los números bajo los símbolos de "estimulación inicial" (bloques grises) indican la duración del estímulo en cada protocolo

B. Respuesta por secreción de IFN- γ medida por ELISA. Las líneas de puntos unen el valor medio obtenido en cada protocolo para células del mismo paciente. Los resultados se muestran como índice estimulador (IE). Los colores de los puntos y barras indican a qué grupo pertenece cada donante: rojo: pacientes con cardiopatía chagásica crónica; azul: pacientes con enfermedad de Chagas asintomática; gris: sujetos no infectados.

En conclusión, este resultado demuestra la utilidad de las B-LCL autólogas como presentadoras de antígenos en protocolos de detección de linfocitos T específicos contra *T. cruzi*.

4.2. Generación de líneas celulares de linfocitos T específicos contra *T. cruzi* a partir de linfocitos T CD4⁺ de memoria

4.2.1. Efecto del estímulo inicial en la expansión de linfocitos T específicos contra *T. cruzi* a partir de linfocitos T CD4⁺ de memoria

Dados los resultados presentados hasta el momento, se hipotetizó que utilizar linfocitos T de memoria como población de partida, en lugar de CMN totales, podría ser favorable a la amplificación de linfocitos T antígeno-específicos que surgieron *in vivo*, como parte de la respuesta frente a la infección con *T. cruzi*. Con el fin de contribuir al escaso conocimiento sobre la especificidad de los linfocitos T CD4⁺ de memoria en el contexto de la enfermedad de Chagas, se decidió enfocar el estudio en esta población.

A partir de CMN de un paciente con enfermedad de Chagas asintomática (RM30) y un individuo no infectado con *T. cruzi* (MM), se separaron las células

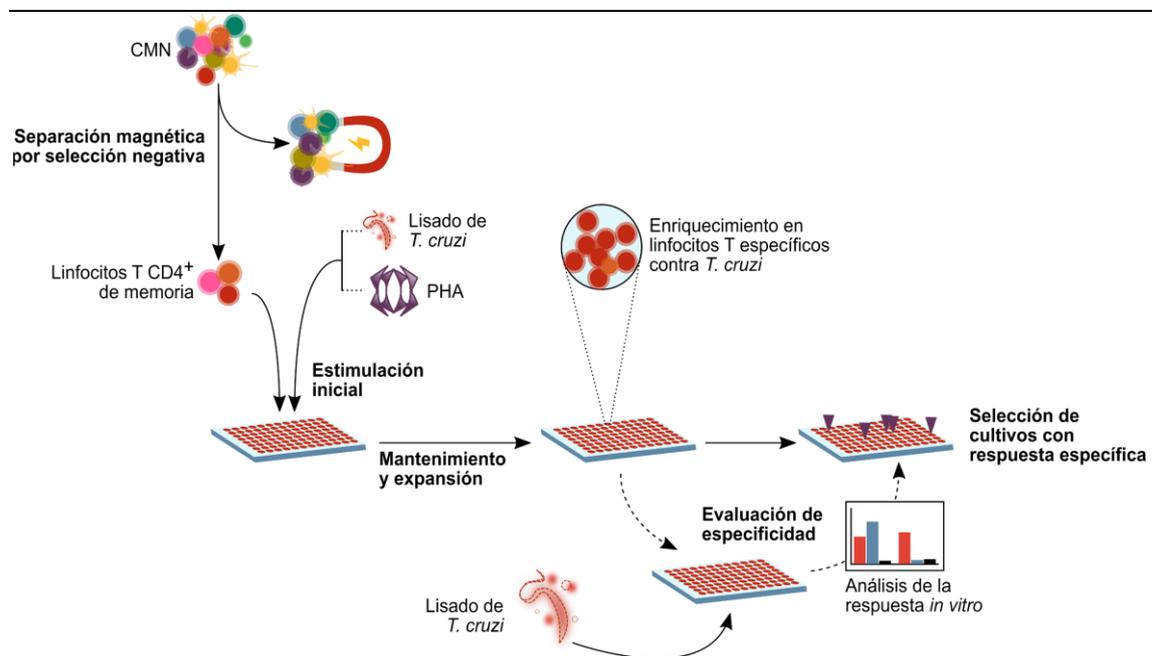


Figura 20

Representación esquemática del protocolo de estimulación y detección de cultivos específicos contra *T. cruzi* generados a partir de linfocitos T CD4⁺ de memoria.

CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ por un método magnético de selección negativa, y se establecieron cultivos utilizando dos condiciones de estimulación inicial distintas: con lisado de *T. cruzi* (expansión antígeno-específica, selectiva) o con PHA (expansión no antígeno-específica, no selectiva). El protocolo seguido se esquematiza en la **Figura 20**, y en la línea de tiempo de la **Figura 21A**. La estimulación de los cultivos de ambos sujetos con PHA resultó en la clara expansión de todos los pocillos sembrados. Por el contrario, los porcentajes de pocillos que presentaron crecimiento celular en respuesta al lisado de *T. cruzi* fueron menores, y significativamente diferentes entre sujetos (58,3% para RM30 vs 12,4% para MM, test exacto de Fischer, $p < 0,001$, **Figura 21B, C**).

Al cabo de 27 a 32 días de cultivo (dependiendo del crecimiento celular), aproximadamente 5×10^3 células de cada pocillo de cultivo fueron desafiadas para evaluar su capacidad de responder específicamente frente a lisado de *T. cruzi*, utilizando B-LCL autólogas, pre-cargadas por 18 h con los antígenos e irradiadas como CPA. Los resultados de este experimento mostraron que una proporción mayoritaria de los cultivos de RM30 inicialmente estimulados con lisado del parásito respondieron contra los antígenos de *T. cruzi* en el desafío (73,2% por secreción de IFN- γ , 17,9% por proliferación, **Figura 21E**) en contraste con el número considerablemente menor de cultivos positivos entre aquellos inicialmente estimulados con PHA (25,0% por secreción de IFN- γ , 4,2% por proliferación, **Figura 21D**). Por otra parte, 21,0% de los cultivos del sujeto no infectado MM inicialmente expandidos con lisado (tan solo el 1,5% sobre el total de los pocillos sembrados) respondió por secreción de dicha citoquina, y ninguno respondió por proliferación (**Figura 21B-E**). Más aún, los niveles de secreción de IFN- γ medidos al desafiar los cultivos inicialmente expandidos con lisado de *T. cruzi* fueron significativamente mayores para el paciente con Chagas crónico en comparación con el sujeto no infectado ($p < 0,01$, test de Mann-Whitney).

Con el fin de caracterizar el perfil funcional de las células expandidas, se realizó un ensayo de detección de citoquinas múltiples (“multiplex”, método MesoScale Discovery) en sobrenadantes seleccionados del mismo experimento de evaluación de especificidad, y agrupados según si presentaron o no respuesta específica frente a antígenos del parásito por secreción de IFN- γ . En primera instancia, se comprobó la consistencia en la detección de IFN- γ por ambos métodos, observándose un alto grado de correlación ($r^2 = 0,86$, **Figura 22A**). Las citoquinas evaluadas, que comprendieron miembros de los perfiles T_{H1}, T_{H2} y

T_{H17}, fueron IL-2, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-4, IL-13, IL-10 e IL-17A. Los resultados obtenidos se grafican en la **Figura 22B**, e indicaron que las células expandidas no tienen un perfil homogéneo de secreción de citoquinas. Aunque IL-17A parece tener cambios importantes en la intensidad de su secreción entre cultivos, los valores de concentración obtenidos cayeron en la zona de baja concentración (y, por ende, baja precisión) de la curva estándar. Se evidenció que TNF- α , GM-CSF e IL-4 fueron diferencialmente secretadas en respuesta al lisado de *T. cruzi* en la mayoría de los cultivos IFN- γ ⁺ evaluados (**Figura 22C**), lo cual las hace interesantes como método de evaluación de la respuesta específica frente al parásito. Además, algunos cultivos clasificados como IFN- γ mostraron altos IE para GM-CSF e IL-4, señalando la importancia de utilizar múltiples parámetros para la selección de cultivos en función de su respuesta antígeno-específica.

Expansión y detección *ex vivo* de linfocitos T de memoria específicos contra *T. cruzi* de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

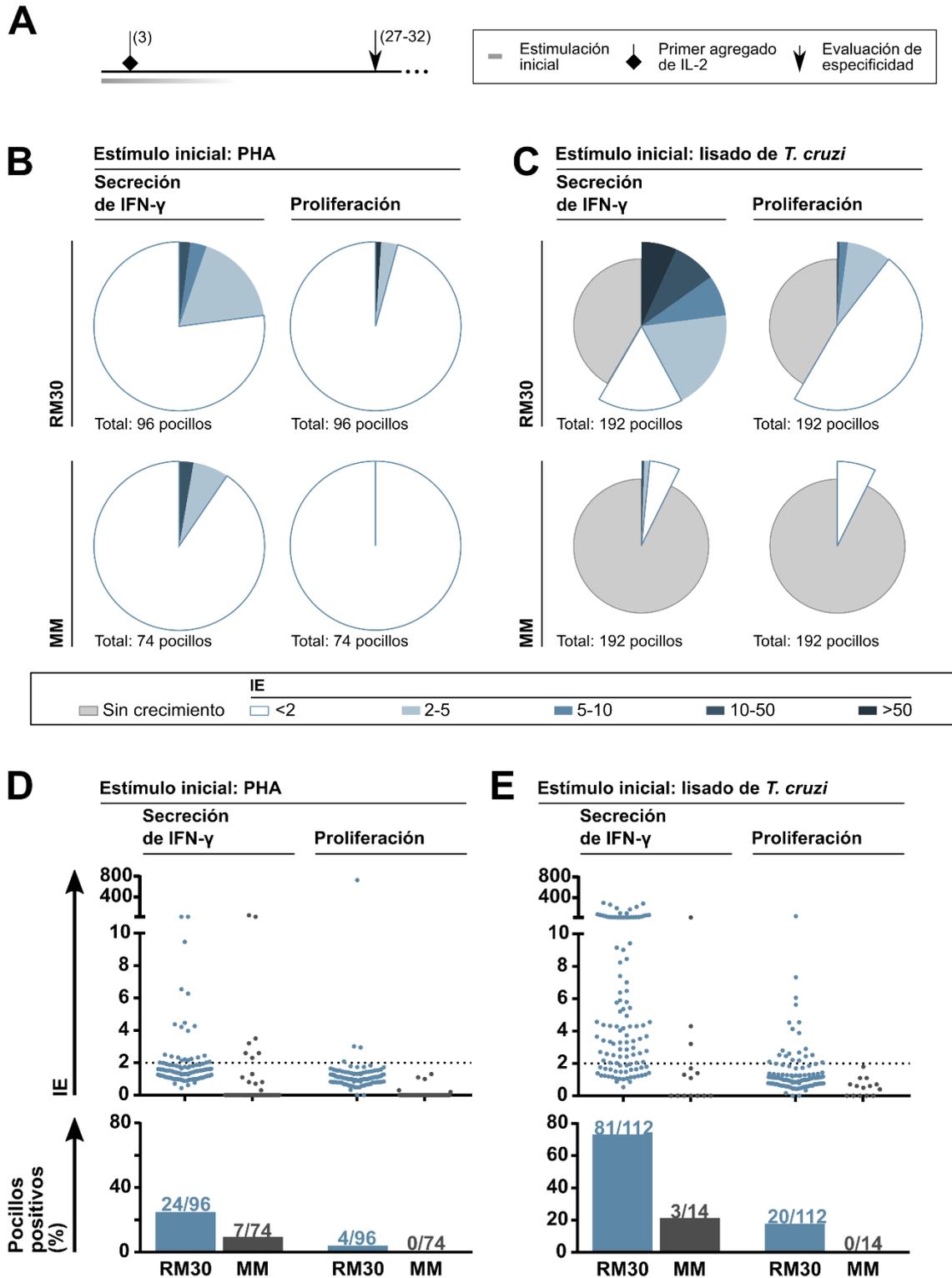


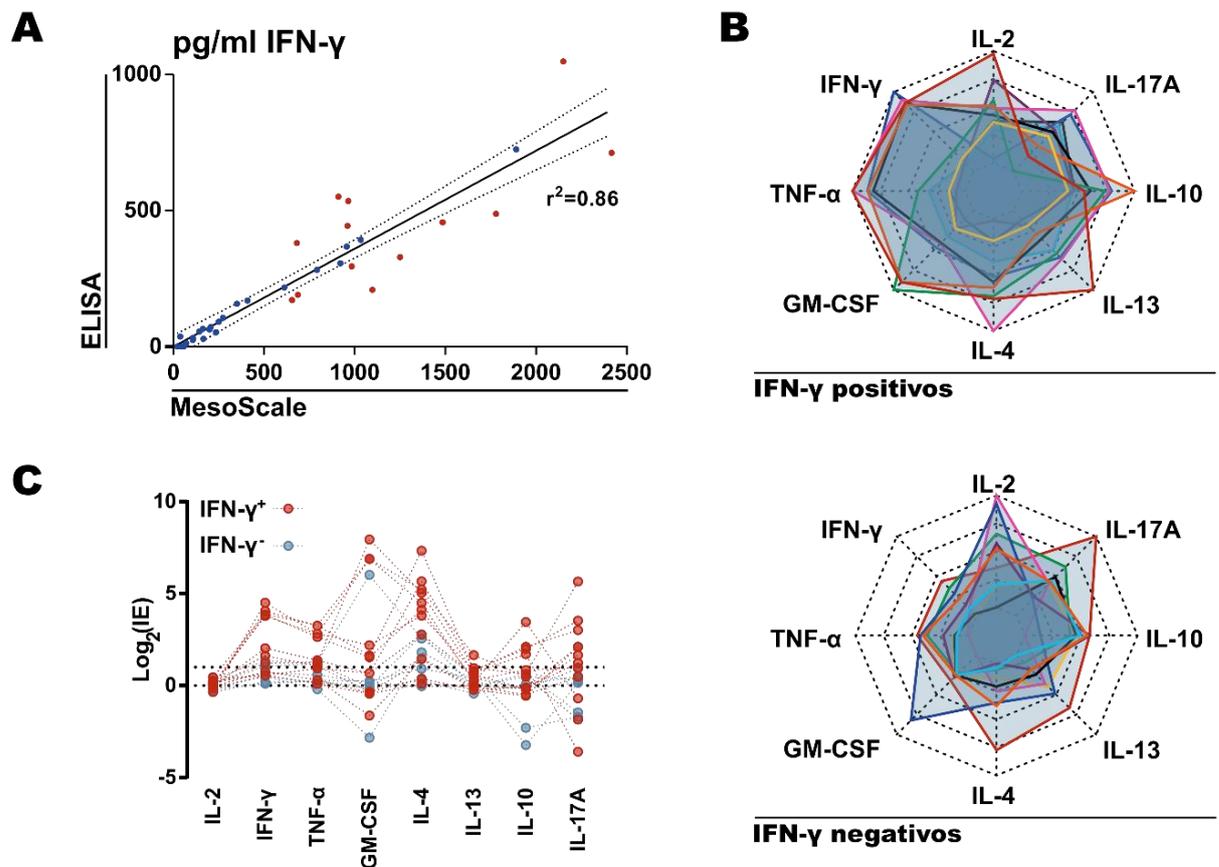
Figura 21

Efecto del estímulo inicial de linfocitos T CD4⁺ de memoria en su respuesta *in vitro* frente a lisado de *T. cruzi*. Linfocitos T CD4⁺ de memoria de un paciente con Chagas asintomático (RM30) y (**cont.**) un individuo no infectado (MM) fueron estimulados con PHA (**B, D**) o lisado de parásito (**C, E**) como se detalla en **Métodos**. Cinco mil células de cada cultivo fueron desafiadas entre los días 27-32 con lisado del parásito y la respuesta específica se midió como secreción de IFN- γ y proliferación. **A**. Representación de línea de tiempo del protocolo de (**continúa**)

estimulación y desafío. Los números junto a cada símbolo indican el día desde el inicio del protocolo al que se realizó cada paso. **B, C.** Gráficos de torta representando los pocillos que presentaron crecimiento celular al día 27, y la distribución de intensidades de respuesta frente a lisado de *T. cruzi*. **D, E.** Valores de IE (gráficos de puntos) y porcentajes de cultivos positivos (gráficos de barra, se consideraron positivos los cultivos con $IE \geq 2$) para cada parámetro medido. Los números sobre las barras indican los cultivos positivos/total analizados.

Figura 22

Ensayo de detección de citoquinas múltiples. **A.** Consistencia entre las concentraciones de IFN- γ medidas por los métodos de ELISA y MesoScale Multiplex sobre el mismo sobrenadante. **B.** Perfiles de secreción de citoquinas detectados en cultivos seleccionados de linfocitos T de RM30 en respuesta a lisado de *T. cruzi*, agrupados según su respuesta detectada por secreción de IFN- γ por ELISA. Los ejes radiales representan pg/ml, en el rango entre el mínimo y máximo valor detectados. Para facilitar la visualización, se asignó un color diferente al borde del polígono correspondiente a cada cultivo (téngase en cuenta que los cultivos representados en uno y otro gráficos son diferentes, y por ende los colores de borde no guardan ninguna relación entre sí). **C.** IE logarítmico (base 2) medido para cada citoquina. Las líneas punteadas unen los valores correspondientes a un mismo cultivo.

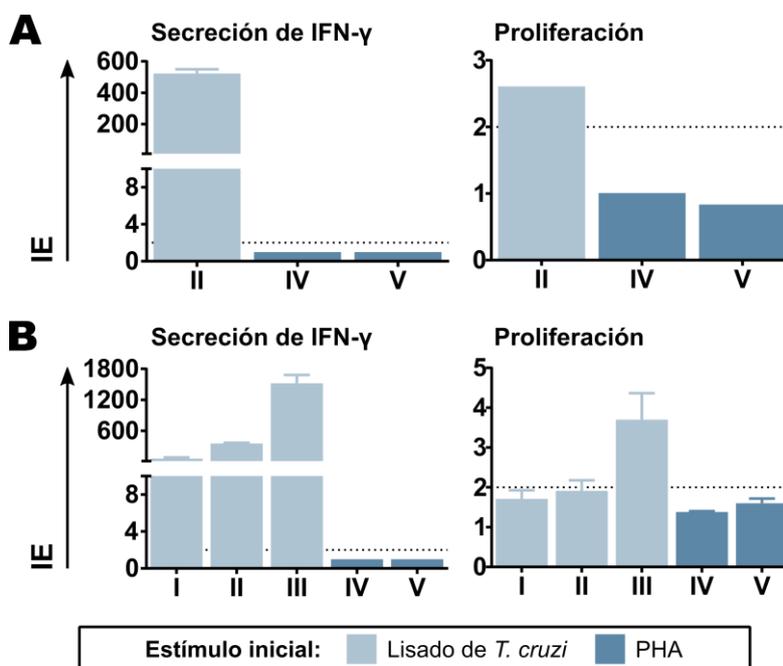


4.2.2. Generación de líneas policlonales de linfocitos T CD4⁺ de memoria específicos contra *T. cruzi*

A partir de la expansión de cultivos detectados como reactivos frente a *T. cruzi* se generaron 5 líneas de linfocitos T (3 a partir de cultivos inicialmente estimulados con lisado del parásito y 2 a partir de cultivos inicialmente estimulados con PHA). Luego de expandirse con PHA, la especificidad de estas líneas fue evaluada nuevamente al día 88 desde el inicio del protocolo, obteniéndose los resultados mostrados en la **Figura 23A**. En ese momento, el número de células de las líneas RM30-I y -III no fue suficiente como para realizar el experimento de evaluación de especificidad sin comprometer la continuidad de los cultivos y, en consecuencia, sólo se ensayaron las líneas RM30-II, -IV y V. Se observó que la línea RM30-II, originada a partir de células inicialmente estimuladas con lisado de *T. cruzi*, mantuvo su capacidad de respuesta por secreción de IFN- γ y proliferación frente al desafío con

Figura 23

Respuesta antígeno específica en cultivos seleccionados del paciente RM30. Cultivos detectados como positivos para respuesta contra lisado del parásito en el experimento de la **Figura 21** fueron seleccionados y utilizados para generar líneas de linfocitos T policlonales *T. cruzi*-específicos (números romanos I-V). Para ello, las células fueron sometidas a 1 (A) y 2 (B) ciclos de expansión con PHA previos a la evaluación de especificidad. Cinco mil células fueron sembradas en pocillos de placas de 96 pocillos y desafiadas con lisado de parásito, utilizando 10⁴ B-LCL autólogas cebadas durante una noche con los antígenos como CPA. Los resultados se muestran como IE para cada parámetro (secreción de IFN- γ y proliferación)



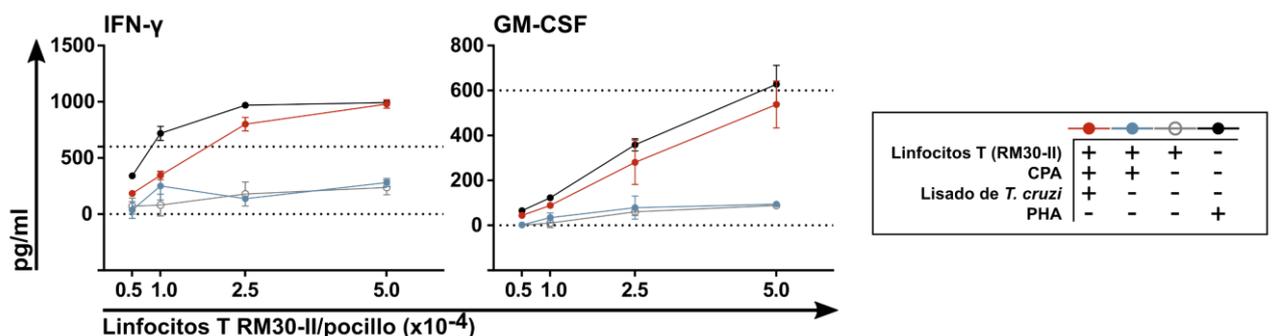
antígenos del parásito, mientras que aquellas generadas a partir de células inicialmente estimuladas con PHA la perdieron.

Este resultado se vio reforzado al evaluar nuevamente la especificidad de la totalidad de las líneas, al día 113 de cultivo. En esta ocasión, se observó secreción de IFN- γ en las 3 líneas generadas mediante la condición de estímulo inicial específico, pero no en las provenientes de la estimulación inicial con PHA, destacando la ventaja de un estímulo inicial antígeno-específico para el establecimiento de líneas de linfocitos T de pacientes crónicos específicos contra el parásito (**Figura 23B**). Adicionalmente, se comprobó la pérdida de la respuesta por proliferación evidenciada en la fase anterior de los cultivos, incluso para las líneas RM30-I y RM30-II que habían sido detectadas como positivas para este parámetro. En ese sentido, y para no limitar la detección de cultivos específicos a la medición de una única citoquina, se decidió en función del experimento de *multiplex* y de resultados previos del grupo de investigación (Longhi et al., 2014), adoptar GM-CSF como segunda lectura de la respuesta frente a antígenos del parásito.

Es interesante destacar que la línea RM30-II, que como se explica más adelante fue la elegida como punto de partida para la generación de líneas monoclonales, mantuvo una capacidad de respuesta específica robusta, incluso luego de 212 días en cultivo y 6 expansiones con PHA (**Figura 24**). No obstante, la intensidad de la respuesta se vio disminuida en comparación con ensayos de especificidad anteriores, generando la necesidad de aumentar el número de linfocitos T/pocillo necesarios para evidenciar una respuesta específica.

Figura 24

Respuesta *T. cruzi*-específica de la línea policlonal de linfocitos T CD4⁺ de memoria RM30-II, al día 212 de cultivo, por secreción de IFN- γ y GM-CSF. Se ensayaron distintos números de linfocitos T/pocillo, y se utilizó una relación 2:1 para las B-LCL autólogas irradiadas pre-cargadas, respecto de los linfocitos T, como CPA.



4.2.3. Generación de líneas monoclonales de linfocitos T CD4⁺ de memoria específicos contra *T. cruzi*

Con el fin de aislar una población clonal de linfocitos T específicos contra *T. cruzi*, se realizó un ensayo de dilución límite (EDL) a partir de la línea policlonal RM30-II. La elección de esta línea como partida para el aislamiento de clones se basó no sólo en la respuesta específica observada en los ensayos anteriores, sino también en su velocidad de crecimiento *in vitro*. Se ensayaron 4 condiciones de densidad celular inicial (10, 3, 1 y 0,1 células/pocillo), sembrándose 10 placas de 96 pocillos para cada condición. Luego de expandir con PHA estos cultivos 7 veces (excepto por los de la condición de 10 células/pocillo, que fueron expandidos 5 veces), se seleccionaron, en función de su crecimiento y su respuesta específica, 7 líneas potencialmente clonales. El proceso desde el ensayo de dilución límite hasta la selección y caracterización de estas líneas se esquematiza en la **Figura 25**.

Días desde EDL >	0	14	28	35	41	56	70	84	98
Expansión >	-	1ra		2da			3ra	4ta	5ta
10 céls./pocillo	960 ▶	355		▶ 197			▶ 29	29 ▶	3
Expansión >	-	1ra	2da		3ra	4ta	5ta	6ta	7ma
3 céls./pocillo	960	960 ▶	144		144 ▶	21	21	21 ▶	6
1 cél./pocillo	960	960 ▶	64		64 ▶	11	11	11 ▶	1
0,3 cél./pocillo	960	960 ▶	19		19 ▶	1	1	1 ▶	0

Criterios de selección: ▶ Crecimiento ▶ Especificidad ▶ Crecimiento y especificidad

Figura 25

Representación esquemática del proceso de clonado por dilución límite (LDA). Los linfocitos T fueron sembrados en placas de 96 pocillos a densidades de 10, 3, 1 y 0,3 células/pocillo (filas), y sometidos a expansión con PHA. Los números indican la cantidad de pocillos que fueron expandidos cada vez (columnas), luego de la ronda de selección anterior, según los criterios indicados por las puntas de flechas.

Al día 99 desde el comienzo del ensayo de LDA, estas 7 líneas mostraron respuesta específica contra el parásito por secreción de IFN- γ y de GM-CSF (**Figura 26**). Adicionalmente, las líneas RM30-II-84 y -85 se desafiaron con lisados de las formas epimastigote y tripomastigote/amastigote de *T. cruzi*. Como se observa en la **Figura 27**, la línea RM30-II-84 respondió específicamente contra ambos lisados, mientras que la línea RM30-II-85 sólo mostró respuesta frente al lisado de epimastigotes.

Expansión y detección ex vivo de linfocitos T de memoria específicos contra *T. cruzi* de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

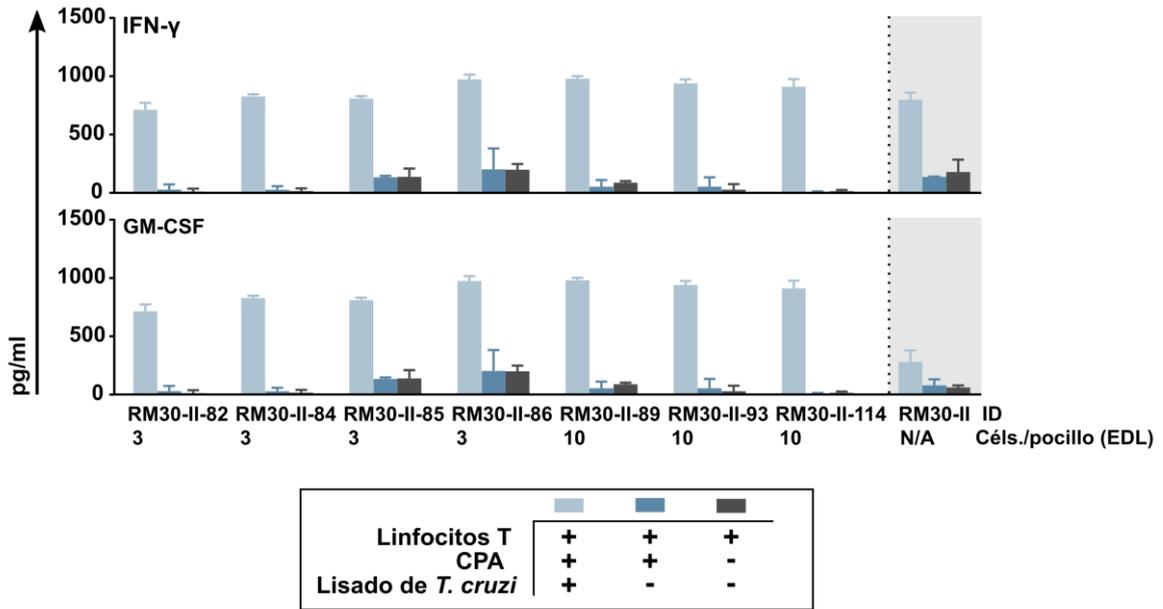


Figura 26

Respuesta específica contra el lisado de *T. cruzi* de las 7 líneas seleccionadas a partir del LDA, y de su línea policlonal de origen, RM30.II, al día 99 del LDA (212 desde el comienzo del cultivo de RM30-II). Se desafiaron $2,5 \times 10^4$ linfocitos T utilizando $5,0 \times 10^4$ B-LCL autólogas cebadas durante una noche como CPA.

Para evaluar la posible monoclonalidad de la línea RM30-II-84, se realizó una caracterización de repertorio de cadena V β del receptor de célula T (TCR-V β) por citometría de flujo, comprobándose la expresión exclusiva de la familia TCR-V β 5.2. Este dato representa un fuerte indicio de la monoclonalidad de esta línea celular. En la **Tabla 4** se muestran los valores de frecuencias obtenidos del análisis citométrico de expresión de familias de TCR-V β para las líneas RM30-II y RM30-II-84.

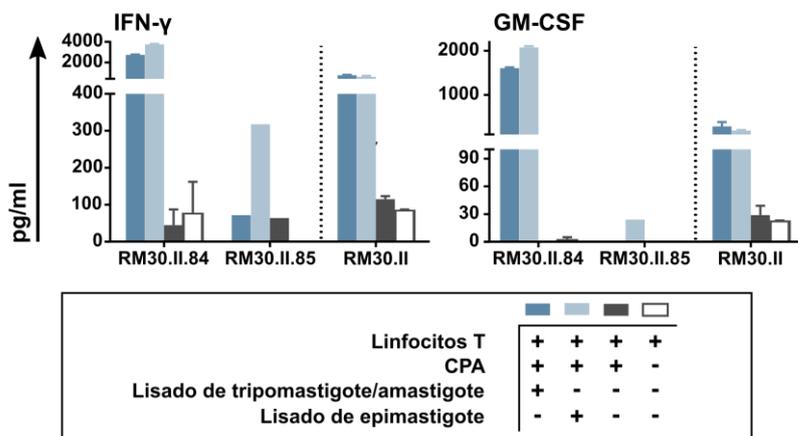


Figura 27

Respuesta de las líneas potencialmente clonales RM30-II-84 y RM30-II-85 frente a los lisados de los estadios de mamífero (tripomastigote/amastigote) y de insecto (epimastigote) del ciclo de vida de *T. cruzi*. Se desafiaron $2,5 \times 10^4$ linfocitos T utilizando $5,0 \times 10^4$ B-LCL autólogas cebadas durante una noche con cada lisado.

Familia de TCR-Vβ	RM30.II	RM30.II.84
1	0,00	0,02
2	*0,16	0,02
3	0,00	0,00
4	0,00	0,01
5.1	*0,39	0,03
5.2	*0,28	*0,92
5.3	0,02	0,00
7.1	0,00	0,02
7.2	0,00	0,02
8	0,00	0,00
9	0,00	0,00
11	0,06	0,01
12	0,00	0,00
13.1	0,03	0,04
13.2	0,00	0,00
13.6	0,00	0,01
14	0,00	0,00
16	0,00	0,00
17	0,00	0,01
18	0,00	0,01
20	0,04	0,00
21.3	0,01	0,02
22	0,00	0,02
23	0,00	0,00

Tabla 4

Frecuencias de familias del gen TCR-V β de expresión detectada en la línea policlonal RM30.II y la línea monoclonal RM30.II.84. Se señalan en negrita y con un asterisco los valores que resultaron claramente distintos de 0,00.

4.3. Discusión.

4.3.1. Relevancia de la metodología desarrollada.

Mediante los resultados alcanzados, hemos logrado establecer un protocolo para la expansión selectiva de linfocitos T CD4⁺ de memoria específicos contra *T. cruzi*. Esta herramienta tiene un gran potencial para el estudio de la respuesta celular en la enfermedad de Chagas, especialmente en cuanto a la especificidad de estas células.

Una de sus ventajas distintivas es que permite la amplificación de poblaciones específicas que se encuentran en baja proporción en la circulación de los pacientes. Esto es especialmente interesante en el marco de respuestas inmunes con epitopes de marcada inmunodominancia, un fenómeno del cual se ha encontrado cierta evidencia en la enfermedad de Chagas.

4.3.2. Importancia de la población de partida y el estímulo inicial para la generación de líneas de linfocitos T patógeno-específicas.

Es sabido que la expansión *in vitro* de linfocitos a partir de CMN puede modificar el fenotipo *ex vivo* de los compartimientos CD4⁺ y CD8⁺, lo cual puede en parte verse reflejado en la pérdida de subconjuntos de células de memoria específicas, cambios en la especificidad y la adquisición de fenotipo efector terminal o exhausto (Geginat et al., 2001; Kim et al., 2006; Tumeh et al., 2010).

En este trabajo, hemos logrado generar líneas de linfocitos T enriquecidas en células específicas contra *T. cruzi* a partir de la estimulación de CMN con lisado del parásito. La frecuencia de cultivos respondedores fue mayor en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, tanto asintomáticos como cardiópatas, en comparación con sujetos no infectados, y se incrementó de manera dependiente del tiempo de estimulación inicial.

Sin embargo, cuando se utilizó la totalidad de las CMN para generar las bibliotecas, algunos cultivos de linfocitos T expandidos a partir de muestras de sujetos no infectados mostraron respuesta *T. cruzi*-específica. Esto podría ser debido a alguna de las siguientes causas:

- Presencia de lectinas o superantígenos en el lisado, que pueden inducir una activación policlonal, no específica de linfocitos T;
- Una respuesta específica primaria por activación de linfocitos T vírgenes;

- Linfocitos T de memoria reactivos contra epitopes propios del hospedero o de otro patógeno que presenten reactividad cruzada con epitopes de *T. cruzi*.

En ese sentido, vale la pena mencionar los resultados de Piuvezam *et al.* (1993), quienes generaron líneas de linfocitos T a partir de CMN de donantes no infectados por estimulación durante 4 semanas con lisado de *T. cruzi*. Según sus resultados, el fenotipo predominante en esas líneas era de células de memoria (97% de linfocitos CD45RO⁺), sugiriendo que, o bien el lisado de parásito contiene epitopes que reaccionan de forma cruzada con otros antígenos de origen ambiental, o que es posible la generación *in vitro* de linfocitos T con fenotipo de células de memoria, mediante la estimulación con antígenos del parásito. A su vez, la proliferación observada por estos autores en las líneas generadas mostró ser CMH dependiente, evidencia en contra de la hipótesis de la activación por lectinas y los superantígenos como potencial causa de la reactividad observada en cultivos generados a partir de individuos no infectados.

Con el fin de minimizar la contribución de la expansión de linfocitos T vírgenes reactivos contra *T. cruzi*, intentamos generar líneas de linfocitos T a partir de cultivos enriquecidos en linfocitos de memoria, en lugar de CMN totales. Nuestra observación de cierto grado de reactividad en linfocitos CD4⁺ de memoria de un sujeto no infectado favorece la hipótesis de la reactividad cruzada, señalando que estas células han sido probablemente seleccionadas *in vivo* durante el montaje de una respuesta adaptativa a agentes no relacionados con *T. cruzi*, y presentan reacción cruzada contra epitopes de *T. cruzi*. Es también probable que estas células pudieran ser activadas tempranamente en caso de que este sujeto contrajera la infección por primera vez y, por ende, es de interés el estudio de su especificidad. No obstante, bajo nuestras condiciones experimentales, la frecuencia y reactividad de tales cultivos fue significativamente menor que en aquellos derivados de un paciente con enfermedad de Chagas.

Otra conclusión relevante de nuestros resultados yace en el hecho de que, para los linfocitos T CD4⁺ de memoria inicialmente estimulados con lisado de *T. cruzi*, la proporción de los cultivos que exhibieron crecimiento celular fue significativamente mayor en el paciente con enfermedad de Chagas RM30 en comparación con el sujeto no infectado MM. Por el contrario, cuando el estímulo inicial fue PHA, se observó crecimiento celular en todos los cultivos

sembrados, independientemente del sujeto. Además, la estimulación de las células del paciente con lisado de parásito llevó no sólo a una mayor proporción de cultivos reactivos contra el parásito, sino también a respuestas más intensas. Al respecto, Geiger *et al.* (2009) demostraron que, dentro del compartimiento de memoria, la estimulación policlonal de linfocitos T CD4⁺ con PHA permite la expansión en alta proporción de células de memoria específicas contra antígenos de tétanos, citomegalovirus y *Mycobacterium tuberculosis*. De todos modos, y a pesar de que pudimos reproducir este fenómeno con células de pacientes con enfermedad de Chagas, nuestros resultados destacan la ventaja de la estimulación inicial con lisado de parásito para incrementar la frecuencia en la que se detectan cultivos específicos, permitiendo una mejor amplificación de linfocitos T patógeno-específicos. Esta conclusión concuerda con resultados encontrados por otros autores, quienes también proponen protocolos basados en estimulación inicial antígeno-específica para la expansión de linfocitos T específicos contra *M. tuberculosis* (Lewinsohn *et al.*, 2000, 2007).

4.3.3. Efecto de las estimulaciones con PHA sobre los cultivos de linfocitos T patógeno-específicos.

Con el fin de alcanzar números de células suficientes para la ejecución de los experimentos de especificidad y caracterización sin imposibilitar la mantención de las líneas generadas, un paso crítico es la expansión de los cultivos. Nuestros resultados muestran que, la aplicación de dos rondas de re-estimulación inespecífica con PHA puede incrementar el número de linfocitos T vírgenes/con reactividad cruzada, no vinculados a la infección, tal y como puede observarse en la respuesta proliferativa evidenciada en linfocitos T derivados de CMN de sujetos no infectados. Adicionalmente, cada ronda de re-estimulación inespecífica afectó la especificidad de las poblaciones en cultivo. Este cambio en la respuesta específica puede estar asociado al efecto directo del mitógeno sobre la funcionalidad del linfocito T, o ser consecuencia del enriquecimiento del cultivo en ciertos linfocitos T en detrimento de otros, es decir, a la dinámica poblacional interna de cada cultivo, llevando a la ganancia o pérdida en frecuencia de las células parásito-específicas.

El mismo fenómeno pudo observarse en las líneas RM30-IV y -V, generadas a partir de la estimulación inespecífica de linfocitos T CD4⁺ de memoria del paciente asintomático RM30. Por el contrario, la especificidad de las líneas RM30-I, -II y -III, generadas a partir de la estimulación antígeno-específica del mismo subconjunto T, parece ser estable a largo plazo,

independientemente del número de expansiones con PHA. En particular, la línea RM30-II pudo mantenerse en cultivo por tiempos muy largos, demostrando mantener su capacidad de respuesta específica más allá del día 212 desde su generación, y de 6 expansiones con mitógeno.

La información acumulada a lo largo de este trabajo favorece la hipótesis de que la pérdida de repuesta específica de cultivos policlonales expandidos *in vitro* es atribuible a la amplificación inespecífica de linfocitos T de diferentes especificidades, en detrimento de la proporción de linfocitos T específicos. Como contrapartida, la generación de líneas policlonales a partir de linfocitos T de memoria, estimulados inicialmente con antígenos específicos, se perfila como una herramienta muy útil para la superación de este obstáculo.

4.3.4. Parámetros de detección de cultivos específicos.

Durante la optimización de las variables metodológicas del cultivo *in vitro* para la expansión selectiva de linfocitos T patógeno-específicos de memoria, utilizamos la secreción de IFN- γ y la proliferación celular como lectura de la respuesta específica. Ambos parámetros mostraron ser robustos en el margen de tiempos de cultivo cortos y medianos (inferiores a los 50 días a partir del estímulo inicial). No obstante, durante la generación de líneas policlonales a partir de linfocitos T CD4⁺ de memoria, se verificó una disminución en la respuesta proliferativa específica a lo largo del proceso de expansión de los cultivos. Este fenómeno, que podría ser el reflejo de un proceso de diferenciación *in vitro* de las células de memoria hacia un perfil efector terminal, compromete la utilidad de la medida de proliferación como parámetro de la respuesta antígeno-específica.

La cuantificación simultánea de múltiples citoquinas demostró que algunos cultivos que habían sido clasificados como no específicos en función de su respuesta por secreción de IFN- γ mostraron una producción diferencial de GM-CSF e IL-4 frente al desafío con antígenos de *T. cruzi*. Esto pone de manifiesto la existencia de diferentes perfiles funcionales de linfocitos T de memoria específicos contra el parásito, algunos de los cuales carecen de secreción diferencial de IFN- γ .

En conjunto, estos resultados destacan la importancia a nivel metodológico de la utilización de múltiples parámetros para la detección de células patógeno-específicos, con el objetivo de maximizar el número y la diversidad funcional de los cultivos seleccionados.

4.3.5. Utilización de linfocitos B autólogos inmortalizados como células presentadoras de antígenos.

A pesar de que las CMN o las células dendríticas autólogas son una mejor fuente de las llamadas células presentadoras “profesionales” de antígenos, su utilización depende de la toma de grandes volúmenes de sangre o de donaciones reiteradas del mismo sujeto. Por el contrario, aunque los linfocitos B autólogos inmortalizados tienen una menor capacidad de presentar efectivamente antígenos solubles que los monocitos y las células dendríticas, constituyen una fuente sustentable y escalable de CPA. Si bien ya se conocían reportes de su utilización en protocolos que requieren la presentación de antígenos *in vitro* a linfocitos T, los resultados presentados en este trabajo son, a nuestro entender, la primera demostración de que pueden emplearse para la presentación de antígenos de parásitos protozoarios complejos, como *T. cruzi*. En ese sentido, hemos mostrado que tanto las CMN como las B-LCL autólogas irradiadas inducen perfiles de secreción de IFN- γ similares en linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas asintomáticos y con cardiopatía.

4.3.6. Generación de líneas clonales de linfocitos T CD4⁺ de memoria específicas contra *T. cruzi*.

Luego del ensayo de dilución límite, las líneas celulares, generadas a partir de linfocitos T CD4⁺ de memoria de un paciente con enfermedad de Chagas asintomática y mantenidas bajo las condiciones de cultivo mencionadas, conservaron su capacidad de respuesta específica contra *T. cruzi* por más de 98 días. Más aún, la línea RM30-II-84 respondió contra lisados de las formas epimastigote y tripomastigote/amastigote con intensidades similares, indicando que estas células reconocen un epítotope común a ambos estadios del ciclo de vida del parásito.

El análisis citométrico de TCR-V β demostró una prevalencia de las familias TCR-V β 2, 5.1 y 5.2 en la línea RM30-II, mientras que su clon derivado RM30-II-84 expresa TCR-V β 5.2 de manera prácticamente exclusiva. Este resultado va en concordancia con el obtenido por otros autores, que señalan un uso preferencial de esta familia del receptor en las poblaciones específicas expandidas durante la infección (Fernández-Mestre et al., 2002; Menezes et al., 2004).

4.3.7. Perspectivas.

La utilidad de la obtención de líneas de linfocitos T patógeno-específicas, poli- y monoclonales, radica en que permite, mediante el proceso de

amplificación *ex vivo*, la caracterización de poblaciones involucradas en la respuesta inmune frente a la infección. En particular, nuestro interés se enfoca en la disección de la especificidad de dicha respuesta.

La obtención de líneas clonales de linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas permitirá utilizar la estrategia de el escaneo posicional de bibliotecas combinatoriales de péptidos sintéticos (en inglés, PS-SCL, por *Positional Scanning Synthetic Combinatorial Libraries*) para el estudio de la especificidad de linfocitos T específicos contra *T. cruzi* (Pinilla et al., 2012; Judkowski et al., 2015). Estas bibliotecas consisten en 200 mezclas de decapeptidos, ordenadas en 10 sub-bibliotecas (una para cada posición en el decapeptido) tales que en los péptidos de cada mezcla se fija en esa posición de la secuencia uno de los 20 aminoácidos, mientras que las otras 9 posiciones son rellenadas con los demás 19 aminoácidos al azar. De esta forma, la biblioteca comprende todos los decámeros posibles ($20^{10} = 1,024 \times 10^{13}$). Al utilizarlas para desafiar una población clonal de linfocitos T, de manera de obtener un valor experimental de respuesta para cada mezcla, la especificidad a nivel de epítipo de ese clonotipo puede determinarse al analizarse el aminoácido “fijo” de las mezclas que generaron respuesta, para cada sub-biblioteca. De esta manera, se identifican los residuos “activos” en cada posición del péptido para el cual el TCR de la línea celular estudiada es específico, elucidándose la secuencia del epítipo putativo activador de esa línea clonal de linfocito T. A partir de este dato, la aplicación de un análisis biométrico permite rastrear en la base de datos de secuencias de *T. cruzi* el antígeno correspondiente al epítipo putativo detectado (Pinilla et al., 2012; Santos et al., 2013).

Esta estrategia es especialmente útil para la identificación de nuevos antígenos, y se la denomina descubrimiento de antígenos dirigido por linfocitos T (en inglés, *T cell-driven antigen discovery*). En ese aspecto, tiene un gran potencial para la captura de especificidades generadoras de memoria inmune, que podrían resultar enmascaradas al estudiarse en el contexto de una respuesta signada por la inmunodominancia de unos pocos antígenos. Otra ventaja crucial de este método es su independencia respecto de los efectos de la restricción por HLA de los epítopes, dada su utilización de células autólogas como CPA en la evaluación *in vitro* de la especificidad (Judkowski et al., 2015).

Más allá de la especificidad, resta también demostrarse si, partiendo de linfocitos T de memoria CD8⁺ en lugar de CD4⁺, pueden también alcanzarse

Expansión y detección *ex vivo* de linfocitos T de memoria específicos contra *T. cruzi* de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

líneas poli- y monoclonales específicas contra el parásito. Otra posibilidad abierta a la exploración en función de nuestros resultados es la generación de líneas a partir de muestras de pacientes con cardiopatía chagásica crónica. Aunque en principio nos hemos enfocado en el estudio de la respuesta en pacientes asintomáticos, sería interesante evaluar la utilidad del protocolo descrito para la expansión de poblaciones de memoria en este tipo de paciente. No obstante, dado que se ha demostrado una asociación entre una mayor frecuencia de linfocitos T CD4⁺ exhaustos y la severidad de las manifestaciones cardíacas de la enfermedad (Albareda et al., 2009, 2013), puede esperarse una mayor dificultad en alcanzar ese objetivo. Es probable que la proporción de cultivos positivos expandidos mediante el estímulo inicial no sea tan alta como en el paciente asintomático estudiado, o que sea más difícil su expansión *in vitro*.

5. Aproximación bioinformática al descubrimiento de epitopes de *T. cruzi* reconocidos por linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

5.1. Resultados

5.1.1. Predicción bioinformática de epitopes T de *Trypanosoma cruzi*

Partiendo de las secuencias de las 53 proteínas de *T. cruzi* anotadas en la base de datos de inmunopeptidos (IEDB, <http://www.iedb.org>), se predijeron las secuencias peptídicas de alto potencial inmunogénico, siguiendo un *pipeline* desarrollado por el Dr. M. Nielsen y colaboradores, descrito en Materiales y Métodos. A partir de estas secuencias, se extrajeron virtualmente todos los decapentámeros (péptidos de 15 aminoácidos de largo) posibles y se seleccionaron aquellos conservados entre las cepas del parásito cuyos genomas están completamente secuenciados y anotados en la base de datos TriTryp (<http://www.tritrypdb.org>), Sylvio X10 y CL Brener. Las secuencias con solapamiento de 9 o más aminoácidos con secuencias de *Homo sapiens* fueron descartadas. El resultado de este tamizaje inicial fue un total de 4.387 secuencias peptídicas que se sometieron al proceso de predicción bioinformática de epítopes.

Se utilizó el algoritmo MHCPan para predecir la afinidad teórica de los nona- y decámeros únicos contenidos en dichas secuencias por las moléculas de HLA-A y -B de alelos prevalentes en Latinoamérica. Además, la afinidad de los

Aproximación bioinformática al descubrimiento de epitopes de *T. cruzi* reconocidos por linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

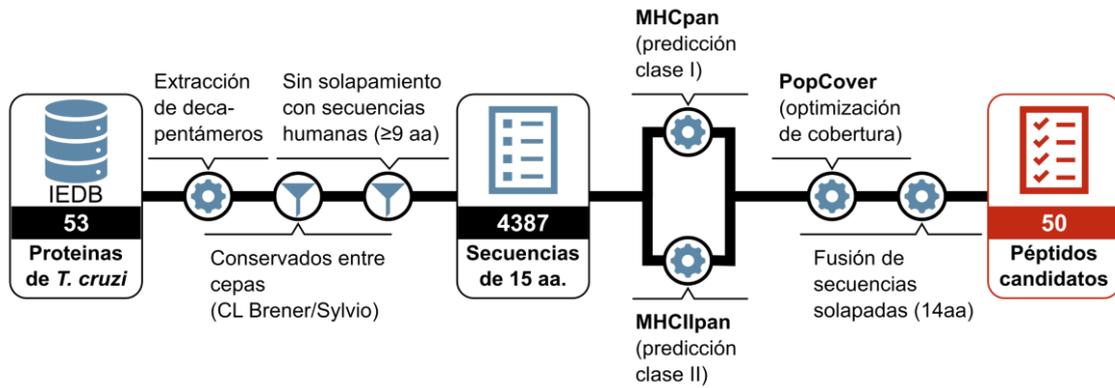


Figura 28

Diagrama de flujo del procedimiento informático utilizado para la predicción de epitopes T de *T. cruzi* (aa.: aminoácidos).

decapentámeros a las moléculas de cadena β de HLA-DR codificadas por las variantes del alelo HLA-DRB más frecuentes en la población mundial se predijo mediante el programa MHCIPan. Cabe aclarar que la elección de este alelo de CMH clase II se basa en que esta cadena es la más polimórfica de ese grupo, y es además la expresada en mayor abundancia por las CPA (Stern y Calvo-Calle, 2009). Adicionalmente, los alelos HLA-DRA que codifican las cadenas α que completan el CMH clase II HLA-DR son monomórficas, y por ende no aportan variabilidad a la fuerza con la que los péptidos se unen al mismo (Stern y Calvo-Calle, 2009; Oyarzun y Kobe, 2015). Sobre el resultado de ambas predicciones, se utilizó el método PopCover para optimizar la cobertura de alelos de HLA. El resultado de este procedimiento es una lista de secuencias de 15 aminoácidos de largo jerarquizada en función de su afinidad (o la de una parte de su secuencia) por moléculas de CMH de clase I y II, y su promiscuidad de unión a diferentes variantes de dichas moléculas.

Luego de filtrar las secuencias redundantes y unificar las secuencias con solapamientos de 14 aminoácidos en una única secuencia de 16 aminoácidos, se seleccionaron las 50 mejor clasificadas para su síntesis y validación *in vitro*. Este conjunto está conformado por 39 péptidos de 15 aminoácidos y 11 de 16 aminoácidos, cada uno de los cuales cubre al menos 5 alelos de HLA, y 21 alelos en el caso máximo. En la **Figura 28** se esquematiza el proceso *in silico* completo. Las secuencias de los péptidos, así como el número de alelos de HLA cubiertos de los utilizados para la predicción, se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5

Predicción de péptidos de *T. cruzi* conteniendo epitopes de clase I y II. Se indica, para cada péptido, el número identificador asignado para este trabajo, la secuencia aminoacídica, el antígeno del que forman parte, los números de variantes de cada alelo para los que se predijo unión, y el número total de los mismos (continúa en página siguiente).

Péptido	Secuencia	Antígeno	HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA
1	VTVTNVFLYNRPLSV	ASP-2	7	2	11	20
2	GSGVLMEDGTLVFSL	Trans-sialidasa	4	13	3	20
3	VPYYFANNEFTLVAT	Trans-sialidasa	3	9	1	13
4	RQYSFVNHRFTLVAT	ASP-2	5	10	5	20
5	ENQLYHFANYKFTLV	Trans-sialidasa	4	9	7	20
6	PRGRFLLMRDNLASL	par1 (componente del bastón paraflagelar)	4	6	8	18
7	EEKEVMLITAPVYAK	Trans-sialidasa	4	8	1	13
8	FLARLHAAANPHATF	Cruzipaína	3	8	5	16
9	TVKNVFLYNRPLNST	Trans-sialidasa	4	1	8	13
10	TVPYHFANSKFTLVA	FL-160-2	3	12	6	21
11	VFLSHNFTLVASVTI	Trans-sialidasa	6	5	5	16
12	NVLLYKRILTAAELR	Trans-sialidasa	3	2	8	13
13	GRKVMLYTQKVRHSL	Trans-sialidasa	4	0	7	11
14	NQLYHFANHNFTLVA	Trans-sialidasa	4	8	6	18
15	ECQWFLAGHPLTNLS	Cruzipaína	4	6	5	15
16	MLSLVAAVKAPRTHN	Trans-sialidasa	3	0	7	10
17	KLELSVYNCDLAMR	PAR2 (Proteína principal del bastón paraflagelar)	4	6	0	10
18	FRRLYKTLGQLVYKK	PAR2 (Proteína principal del bastón paraflagelar)	2	1	9	12
19	SFVNHRFTLVATVTI	ASP-2	3	4	6	13
20	GVMEDGTLVFPLMA	Trans-sialidasa	1	13	1	15
21	KVMLYTQKVRHSLEV	Trans-sialidasa	4	1	6	11
22	LYHFANYNFTLVATV	Trans-sialidasa	4	8	4	16
23	EAENHRALAALYELV	par1 (componente del bastón paraflagelar)	3	11	0	14
24	RNVMLVTLVPVFSKKA	Trans-sialidasa	4	5	5	14
25	NMSRHLFYSAVLLLL	Trans-sialidasa	5	8	3	16
26	GDSVYMLLGNYSRTK	Trans-sialidasa	2	2	6	10
27	LNRQYTFVDYNFSLV	Trans-sialidasa	6	6	0	12
28	RPNMSRHLFYSAVLL	Trans-sialidasa	3	11	3	17
29	AGYIKAAESWPSIVA	ASP-2	2	3	3	8
30	SVYNCDLAMRCIGMM	PAR2 (Proteína principal del bastón paraflagelar)	2	5	1	8
31	IDGQKVILVSRPVYS	TcCRP/trans-sialidasa	2	0	6	8
32	ANYNFTLVATVSIHK	Trans-sialidasa	2	0	9	11
33	GNELFLLVGSSYFVF	Trans-sialidasa	5	4	2	11

Aproximación bioinformática al descubrimiento de epitopes de *T. cruzi* reconocidos por linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

34	YEFVNACAKLMHQIL	par1 (componente del bastón paraflagelar)	0	4	5	9
35	VPVTVTNVLLYNRPL	Trans-sialidasa	3	6	0	9
36	YVDLMAELRAELSEL	par1 (componente del bastón paraflagelar)	3	5	2	10
37	VTNVFLYNRPLNPTE	Trans-sialidasa	4	1	3	8
38	HRFTLVATVTIHQVP	Trans-sialidasa	2	4	5	11
39	HQEYLEAFRRLYKTL	PAR2 (Proteína principal del bastón paraflagelar)	1	3	5	9
40	KEVMLITAPVYPKDN	Trans-sialidasa	2	8	0	10
41	PNMSRHLFTSAVLLL	Trans-sialidasa	2	9	3	14
42	HFANYNFTLVATVSV	Trans-sialidasa	4	3	4	11
43	IPTAGLVAVFSNASA	Trans-sialidasa	1	9	2	12
44	SELLAASKELRERYR	par1 (componente del bastón paraflagelar)	1	3	1	5
45	HQVALMLQGKASVY	GP82/Trans-sialidasa	2	4	4	10
46	VTFQGAWAEPVGSQ	Trans-sialidasa	6	2	1	9
47	RQRRYQPYHSRHRRL	Cruzipaína	1	2	5	8
48	GKVKDIFASPALVRA	TSA-1	1	0	7	8
49	GSGIVMGNGTLVFPL	Trans-sialidasa	1	7	3	11
50	RHVFLSHDFTLVATV	Trans-sialidasa	5	3	2	10

5.1.2. Evaluación de la inmunogenicidad *in vitro* de los epitopes predichos

5.1.2.1. Fase exploratoria: evaluación de mezclas de péptidos.

Los péptidos seleccionados a partir de los métodos *in silico* descritos fueron adquiridos a un proveedor comercial y aleatorizados en 5 mezclas de 10 péptidos cada una. La conformación de cada mezcla quedó definida tal como se muestra en la **Tabla 6**.

Las mezclas de péptidos I-V se utilizaron para desafiar CMN de pacientes con enfermedad de Chagas asintomática ($n=15$) y con cardiopatía chagásica crónica ($n=15$) en experimentos de ELISPOT, de manera de identificar aquellas mezclas que contenían al menos un péptido inductor de secreción de IFN- γ en dichas células. En paralelo, las muestras fueron desafiadas con lisado de epimastigotes de *T. cruzi* (control de la respuesta específica), PHA (control positivo) o medio sin antígenos adicionales. Se incorporaron también como grupo control muestras de individuos no infectados con *T. cruzi* ($n=5$). La respuesta, cuantificada como unidades formadoras de *spot* (UFS), fue transformada en IE, calculado mediante la división de las UFS de cada

Aproximación bioinformática al descubrimiento de epitopes de *T. cruzi* reconocidos por linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

condición por el valor de las mismas obtenido en la condición sin desafiar. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 29**.

Tabla 6

Conformación de las mezclas de péptidos utilizadas para la fase exploratoria de la validación de los epitopes predichos por métodos bioinformáticos.

Mezcla	Péptido	Secuencia	Mezcla	Péptido	Secuencia
I	#3	TVPYYFANNEFTLVAT	IV	#1	VTVTNVFLYNRPLSV
	#5	ENQLYHFANYKFTLV		#14	NQLYHFANHNFTLVA
	#7	EEKEVMLITAPVYAK		#16	MLSLVAAVKAPRTHN
	#10	TVPYHFANSKFTLVA		#17	KLELSVYNCDLAMR
	#13	GRKVMLYTQKVRHSL		#18	FRRLYKTLGQLVYKK
	#19	SFVNRFTLVATVTI		#34	RYEFVNACAKLMHQIL
	#26	GDSVYMLLGNYSRTK		#36	YVDLMAELRAELSEL
	#44	SELLAASKELRERYR		#38	HRFTLVATVTIHQVPK
	#48	GKVKDIFASPALVRAG		#41	PNMSRHLFTSAVLLL
	#49	GSGIVMGNGTLVFPL		#47	RQRRYQPYHSRHRRL
II	#6	LPRGRFLLMRDNLSAL	V	#4	RQYSFVNRFTLVATV
	#9	TVKNVFLYNRPLNST		#8	FLARLHAAANPHATFG
	#12	NVLLYKRILTAELR		#11	VFLSHNFTLVASVTI
	#20	GVMEDGTLVFPLMA		#23	EAENHRALAALYELV
	#28	RPNMSRHLFYSAVLL		#25	NMSRHLFYSAVLLLL
	#31	IDGQKVILVSRPVYS		#30	SVYNCDLAMRCIGMM
	#32	ANYNFTLVATVSIHK		#33	GNELFLLVGSSYFVF
	#37	VTNVFLYNRPLNPTE		#40	KEVMLITAPVYPKDN
	#39	HQEYLEAFRRLYKTLG		#42	HFANYNFTLVATVSV
	#46	VTFQGAWAEWPVGSQ		#43	IPTAGLVAVFSNASA
III	#2	GSGVLMEDGTLVFSLM			
	#15	VECQWFLAGHPLTNLS			
	#21	KVMLYTQKVRHSLEV			
	#22	LYHFANYNFTLVATV			
	#24	RNVMLVTLVPVFSKKA			
	#27	ELNRQYTFVDYNFSLV			
	#29	AGYIKAAESWPSIVA			
	#35	VPVTVTNVLLYNRPL			
	#45	HQVALMLQGNKASVY			
	#50	RHVFLSHDFTLVATV			

Los resultados obtenidos permitieron agrupar a los pacientes asintomáticos y con cardiopatía dentro de dos subcategorías, según si evidenciaron o no una respuesta medible ($IE \geq 2$) frente al lisado del parásito. Notoriamente, todos los pacientes que respondieron frente a alguna de las mezclas de péptidos, (con una única excepción) estaban contenidos dentro de la subcategoría con respuesta positiva frente a antígenos de *T. cruzi*.

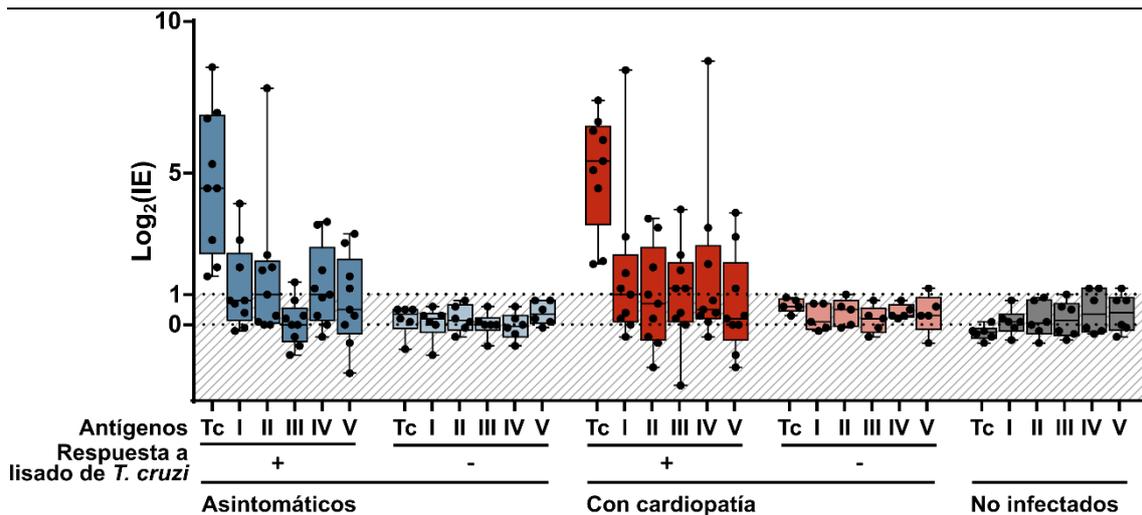


Figura 29

Respuesta por secreción de IFN- γ de las CMN de pacientes y sujetos control frente a lisado de epimastigotes de *T. cruzi* (Tc) y frente a cada una de las mezclas de péptidos (I-V). Los datos se transformaron utilizando el logaritmo en base 2 para volver simétrica la representación visual de IE_{Tc} mayores y menores a 1. Se tomó como valor umbral para determinar una respuesta positiva la duplicación del número de spots respecto del valor basal (es decir, $\text{Log}_2(\text{UFS}_i/\text{UFS}_{NA})=1$, línea punteada superior).

5.1.2.2. Fase de deconvolución: evaluación de péptidos individuales

Aquellas mezclas de péptidos que resultaron positivas para secreción de IFN- γ en la fase exploratoria, fueron sometidas a deconvolución, esto es, se evaluó cada uno de los péptidos en la mezcla de manera individual, utilizando las muestras de pacientes que exhibieron una respuesta específica frente a ella. De esta forma, se pudo atribuir la respuesta generada por cada mezcla a uno o dos de péptidos individuales (**Figura 30**). Con el fin de optimizar el uso de recursos, se priorizó la deconvolución de aquellas mezclas que resultaron en valores de $\text{IE} \geq 2$ y con diferencia de $\text{UFS} \geq 10$ entre la condición de desafío con el péptido y la condición control sin desafiar. Debido a esto, aunque hubo muestras de pacientes para las cuales se detectó respuesta específica contra alguna mezcla de péptidos en términos de IE, no se prosiguió a su deconvolución por no cumplir la condición de diferencia en el número de UFS. Se encontraron en total 7 péptidos activadores de la secreción de IFN- γ en CMN de al menos un paciente con enfermedad de Chagas crónica.

Las secuencias de los péptidos para los que se detectó respuesta se utilizaron para interrogar la IEDB, encontrándose que:

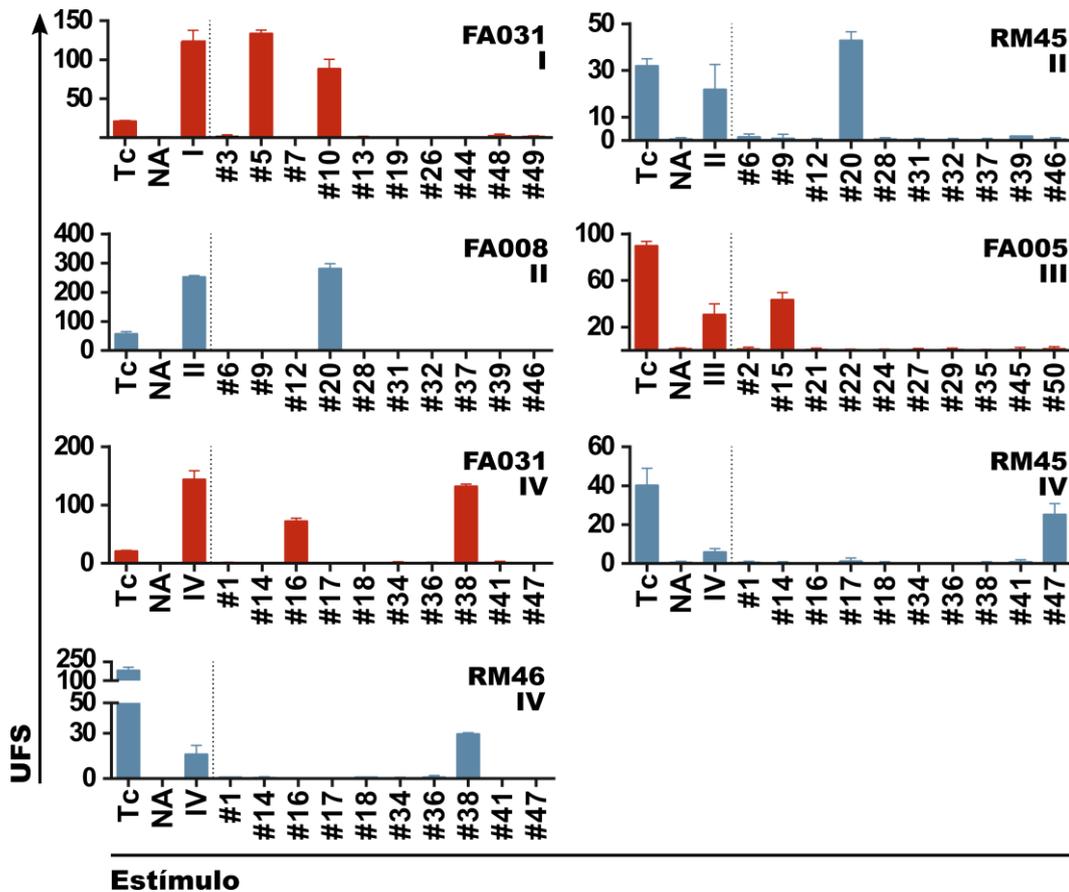


Figura 30

Deconvolución por ELISPOT para IFN- γ de las mezclas de péptidos I, II, III y IV, utilizando CMN de pacientes que dieron respuesta positiva frente a cada una en la fase exploratoria (ver **Figura 29**). Los resultados se muestran como la media y el desvío estándar de las UFS, para cada condición ensayada por triplicado. Se grafican en rojo los resultados correspondientes a pacientes con cardiopatía chagásica crónica, y en azul los de pacientes con enfermedad de Chagas asintomática.

- El péptido #5 (ENQLYHFANYKFTLV) contiene los epitopes TSKB20 (ANYKFTLV) y TSA2-44 (FANYKFTLV), derivados de TcTS y reportados por Martin et al. (2006) como inmunogénicos en ratón y humano, respectivamente.
- El péptido #10 (TVPYHFANSKFTLVA) contiene a los epitopes FANSKFTLV (Fonseca et al., 2005), ANSKFTLV (Martin et al., 2006) y FANSKFTLVA (Fonseca et al., 2005), también de TcTS, encontrados a partir de predicción bioinformática de unión a moléculas de CMH de ratón (H-2kb) y humano (HLA-A*02), pero descriptos como negativos para secreción de IFN- γ por ELISPOT en humano (Fonseca y col. 2005) y ratón (Martin y col. 2006).

Aproximación bioinformática al descubrimiento de epitopes de *T. cruzi* reconocidos por linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

- El péptido #15 (VECQWFLAGHPLTNLS) contiene un epitope de cruzipaína (FLAGHPLTNL), que posee capacidad de unión a HLA-A*02:01 demostrada experimentalmente, pero no induce secreción de IFN- γ por ELISPOT en pacientes que expresan esa variante de HLA-A (Fonseca et al., 2005).
- Los péptidos #16, #20, #38 y #47 contendrían epitopes completamente novedosos, ya que su secuencia no ha sido total ni parcialmente depositada como epitope en IEDB.

5.1.3. Caracterización de los epitopes validados.

5.1.3.1. Cobertura poblacional de la respuesta.

Cada péptido detectado como positivo en la deconvolución se utilizó para desafiar muestras de CMN de pacientes en una cohorte más amplia ($n=25$ para los pacientes asintomáticos y $n=26$ para los pacientes con cardiopatía chagásica crónica). La **Figura 31** muestra los porcentajes de pacientes que presentan respuesta por ELISPOT para IFN- γ frente a cada uno de los péptidos. Cabe mencionar que los pacientes incluidos en la fase exploratoria que no mostraron respuesta positiva frente a ninguna de las mezclas I-V fueron contabilizados como negativos para los péptidos individuales.

Analizándolo desde el punto de vista de la cobertura de cada péptido sobre la muestra poblacional, y como se observa en la **Figura 32**, se encontró que los más ampliamente reconocidos por células de pacientes, tanto asintomáticos como con cardiopatía, fueron el #20 y el #38, frente a los que respondieron un 16% y un 20% de los pacientes evaluados, respectivamente. Es

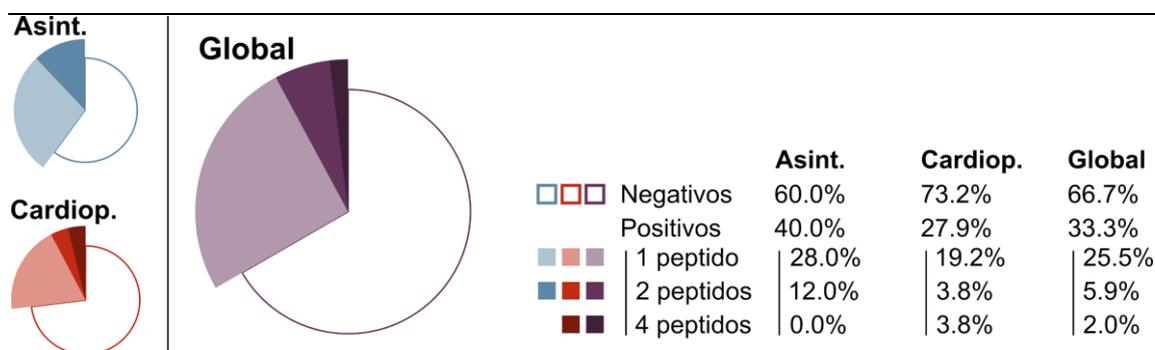


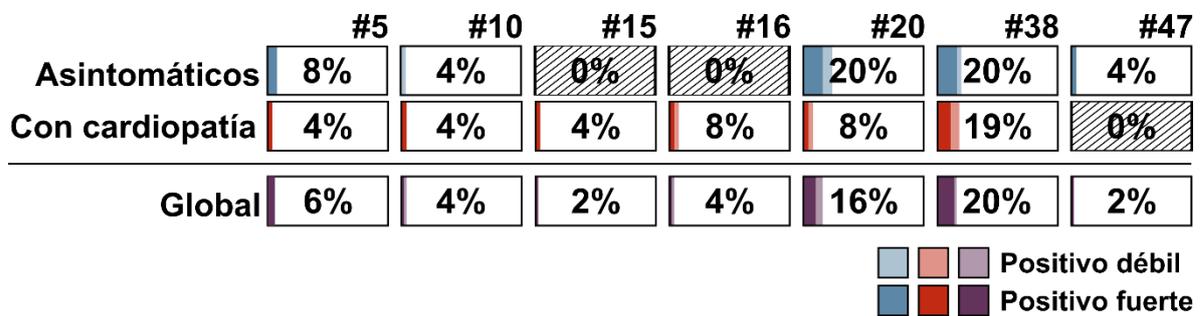
Figura 31

Porcentaje de pacientes agrupados según el número de péptidos contra los que respondieron, según experimentos de ELISPOT para IFN- γ .

interesante señalar que, mientras que el péptido #38 fue reconocido con frecuencias similares en pacientes asintomáticos y con cardiopatía, el péptido #20 indujo secreción de IFN- γ en un porcentaje más de dos veces mayor de pacientes asintomáticos, en comparación con el grupo de pacientes con cardiopatía.

Figura 32

Cobertura poblacional de los epitopes descritos, como frecuencia de pacientes que respondió frente a cada péptido. Se utilizaron 2 criterios para definir positividad: duplicación en UFS respecto del control sin estimular y diferencia de más de 10 UFS respecto de dicho control. En tonalidades oscuras se muestra la fracción que cumplió ambos criterios (positivo fuerte), y en tonalidades claras aquellos que sólo cumplieron el primero (positivo débil). Los porcentajes fueron calculados en función de los positivos totales (fuertes y débiles).



5.1.3.2. Inmuno-relevancia de los epitopes descritos.

Uno de los parámetros que permite caracterizar la relevancia de un determinado epitope en el contexto de la memoria inmune es la dimensión de la respuesta que genera como proporción de la respuesta total frente al patógeno en cuestión. Con el fin de estimar la inmunodominancia de las secuencias de este estudio en los pacientes con respuesta frente a ellas, se calculó la relación entre los valores de UFS observados en las condiciones de desafío con el péptido y con el lisado de parásito. Los resultados de estos cocientes se representan en el gráfico de la **Figura 33**. Los valores obtenidos abarcan un rango entre una representación muy baja de la respuesta frente al péptido en relación con la medida para el lisado (2% en el caso mínimo, FA046 vs #10) hasta un factor de relación mayor a 6 veces (FA031 vs #5). Cabe destacar que los valores obtenidos no guardaron ninguna relación con el grupo clínico de los pacientes. En los péptidos #20 y #38, el número de pacientes positivos permitió analizar estadísticamente este factor, resultando en la ausencia de diferencia significativa entre los valores de pacientes con enfermedad de Chagas asintomática y los del grupo de pacientes con cardiopatía.

Aproximación bioinformática al descubrimiento de epitopes de *T. cruzi* reconocidos por linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

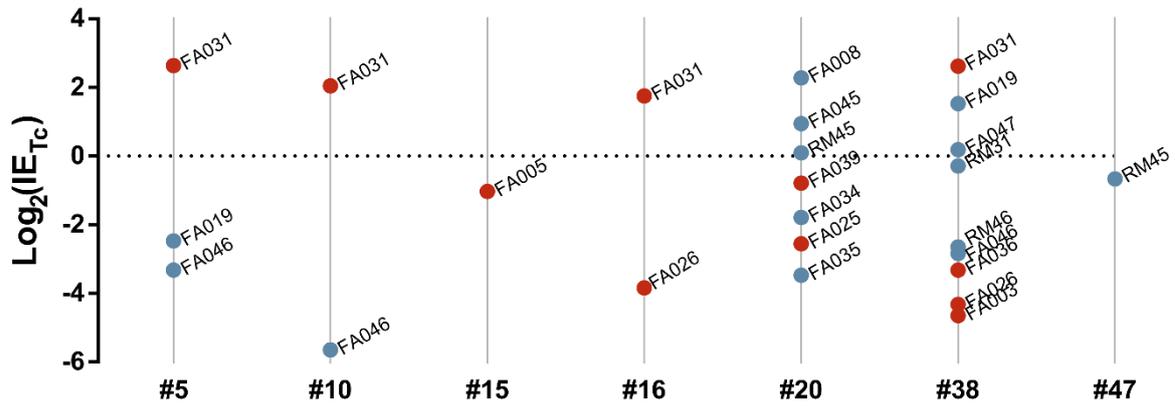


Figura 33

Determinación aproximada de la inmunodominancia de los epitopes contenidos en los péptidos ensayados. Para cada par paciente-péptido positivos, se evaluó el cociente entre las UFS cuantificadas en respuesta al péptido y las producidas frente al lisado de *T. cruzi* (IE_{Tc}). Los datos se transformaron utilizando el logaritmo en base 2 para volver simétrica la representación visual de IE_{Tc} mayores y menores a 1. De esta forma, Log₂(IE_{Tc})=0 significa igualdad de las UFS frente a desafío con lisado de *T. cruzi* y con péptido, valores menores a 0 indican mayor respuesta frente a lisado que frente al péptido, y valores mayores a 0 indican lo opuesto. Se muestran en rojo los puntos correspondientes a pacientes con cardiopatía chagásica crónica, y en azul los de pacientes con enfermedad de Chagas asintomática.

5.1.3.3. Perfil de la respuesta específica contra los péptidos.

Con el objetivo de determinar si la secreción de IFN- γ observada en respuesta a los péptidos estaba asociada a la activación de linfocitos T citotóxicos, colaboradores o ambos, se realizaron experimentos de ELISPOT similares a los ya descritos, pero sustrayendo las poblaciones CD3⁺CD4⁺ o CD3⁺CD8⁺, utilizando un protocolo de separación magnética por selección positiva. Se ensayaron en paralelo, a modo de control, las CMN totales de cada paciente.

Los resultados ilustrados en la **Figura 34** mostraron que para los péptidos #5, #10, #15, #16, #20 y #38 la contribución a la respuesta medida fue predominantemente de los linfocitos T CD4⁺. En tanto, para el paciente RM45 la eliminación de los linfocitos T CD8⁺ abrogó por completo la secreción de IFN- γ frente al péptido #47.

Para caracterizar en mayor profundidad el perfil de las células activadas por estos péptidos, se diseñó un experimento de detección de citoquinas intracitoplasmáticas por citometría de flujo. Lamentablemente, la sensibilidad de esta técnica sólo permitió detectar células IFN- γ ⁺ en el par paciente-péptido que produjeron la señal más alta en experimentos de ELISPOT (FA008 frente al péptido #20). Sin embargo, los resultados mostrados en la **Figura 35A** confirmaron la predominancia de los linfocitos T CD4⁺ en la producción de

IFN- γ . El análisis de expresión de las moléculas CCR7 y CD45RA en la superficie de estas células, representado en la **Figura 35B**, demostró una activación preponderante de linfocitos T_{CM}, puesto que más de un 53% de las células IFN- γ ⁺ presentaron un fenotipo CD45RA⁻CCR7⁺. No obstante, también se vieron células productoras de esta citoquina con fenotipo T_{EM} (CD45RA⁻CCR7⁻, 22% de los eventos IFN- γ ⁺) y naïve (CD45RA⁺CCR7⁺, 23% de los eventos IFN- γ ⁺).

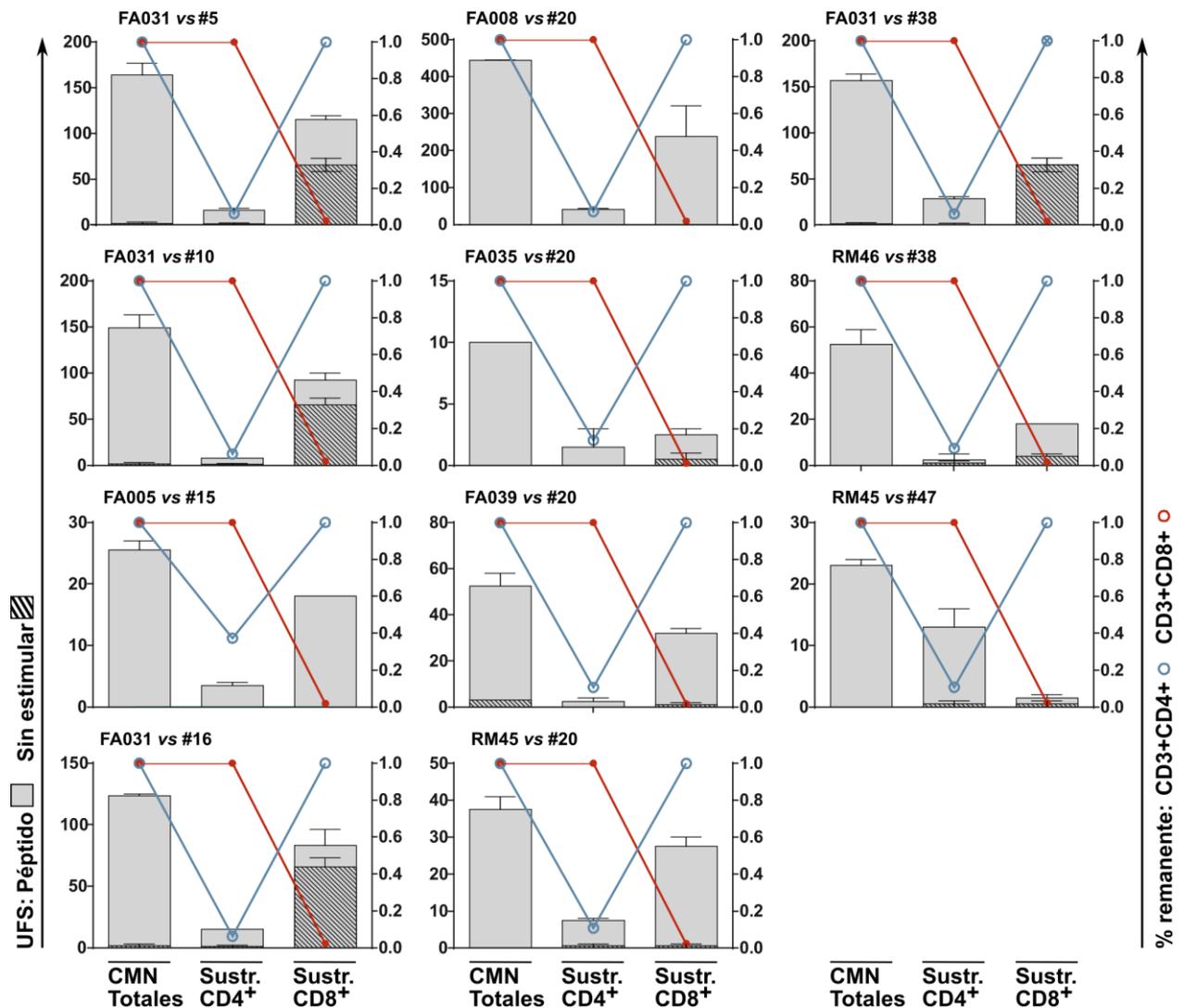


Figura 34

Experimentos de ELISPOT con sustracción de poblaciones CD4⁺ o CD8⁺. Las barras indican la media de pocillos duplicados para cada condición. Los puntos unidos indican el porcentaje remanente de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, calculado según se explica en Materiales y Métodos (3.9.1 Sustracción magnética de poblaciones celulares).

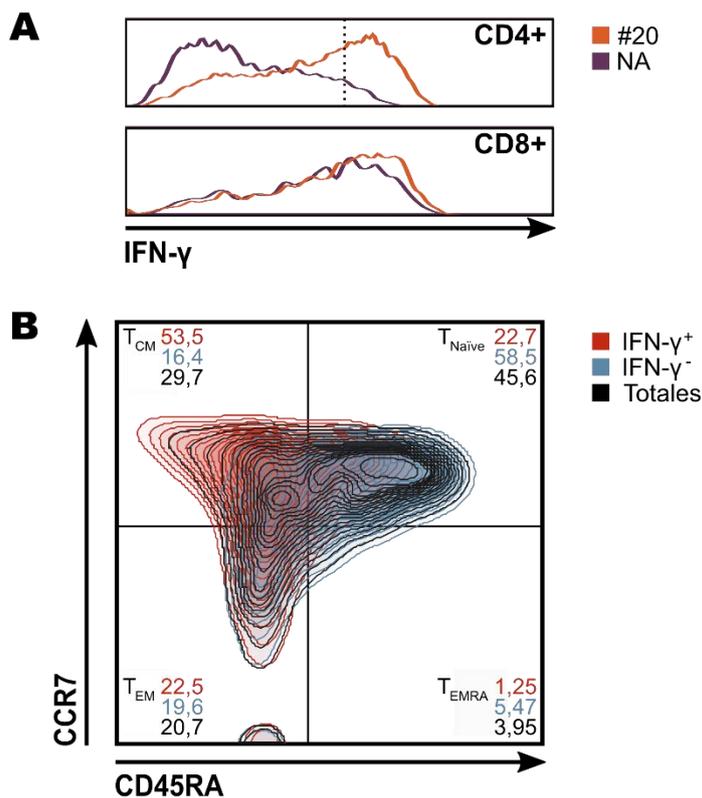


Figura 35

Marcación intracitoplasmática de IFN- γ en CMN del paciente FA008 estimuladas con el péptido #20. **A.** Histogramas de fluorescencia para las condiciones de estimulación (#20) y de control (NA). Los datos representados en la figura corresponden a la población linfocitos/CD3⁺CD8⁻ (arriba) o linfocitos/CD3⁺CD8⁺ (abajo). La línea punteada del histograma superior señala el punto de corte utilizado para definir las poblaciones IFN- γ ⁺ e IFN- γ ⁻ del panel B. **B.** Perfil fenotípico de las células secretoras de IFN- γ en respuesta al péptido #20. Los eventos representados son los seleccionados mediante los umbrales linfocitos/CD3⁺/CD8⁻ (Totales). Las poblaciones IFN- γ ⁺ e IFN- γ ⁻ se definieron en función del corte mostrado con línea de puntos en el panel A (arriba).

5.1.3.4. Predicción de unión de los péptidos a moléculas de CMH expresadas por pacientes

Como primera aproximación al estudio de la restricción por moléculas de CMH de los péptidos reactivos, nos propusimos volver a hacer uso de las herramientas predictivas ya mencionadas. En este caso, en lugar de utilizar datos de prevalencia de variantes polimórficas para seleccionar los alelos de HLA utilizados, se secuenciaron los loci que codifican estas moléculas en muestras de ADN obtenidas de los pacientes FA005, FA008, FA031, RM45 y RM46. Esta información se utilizó, junto con los algoritmos MHCpan y MHCIIpan, para explorar cuáles moléculas de CMH tienen la mayor probabilidad teórica de estar participando en la presentación del/de los epitopes positivos para cada paciente, a los linfocitos T.

Los resultados de la predicción para moléculas de CMH clase I se muestran en la **Tabla 7**, y los de CMH clase II en la **Tabla 8**. Del análisis de los valores obtenidos, se destacan las siguientes conclusiones:

Aproximación bioinformática al descubrimiento de epitopes de *T. cruzi* reconocidos por linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

- Los pacientes FA008 y RM45, ambos con secreción de IFN- γ principalmente de linfocitos T CD4⁺ para el péptido #20, tienen en común la expresión de los alelos HLA-DRB1*01:02, HLA-DPA1*01:03, HLA-DQA1*01:01 y HLA-DQB1*03:02. De estos, el complejo de CMH clase II formado por las cadenas de HLA-DQA1 y HLA-DQB1 mencionadas tiene una alta afinidad, según la predicción, por una secuencia dentro del péptido #20. Estos pacientes no comparten ninguna variante de los alelos de CMH clase I tipificados.
- Los pacientes FA031 y RM46, ambos reactivos contra el péptido #38 y con predominancia de la población CD4⁺ en la secreción de IFN- γ , comparten el alelo HLA-DRB1*07:01 y el par HLA-DQA1*02:01/HLA-DQB1*02:02. Ninguna secuencia dentro de #38 tendría afinidad teórica por esta combinación de cadenas de HLA-DQ, pero el péptido contiene dos decapentámeros solapados que tendrían alta afinidad por la variante de HLA-DRB1 expresada por ambos pacientes. Estos pacientes tampoco comparten ninguna variante de los alelos de CMH clase I tipificados.
- Para el par paciente-péptido RM45-#47, para el cual la evidencia experimental indicó que la secreción de IFN- γ es esencialmente atribuible al linaje de los linfocitos T CD8⁺, los algoritmos bioinformáticos predijeron la presencia de 3 secuencias de 10 y 11 aminoácidos dentro del péptido con alta afinidad por la molécula codificada por la variante HLA-A*31:01. Por otro lado, y en concordancia con los resultados experimentales, no se predicen epitopes con alta afinidad por ninguna de moléculas de MHC clase II codificada por los alelos que este paciente posee.

Tabla 7

Predicción de epitopes en los péptidos reactivos utilizando información de las variantes de CMH de clase I (HLA-A, -B y -C) expresadas por pacientes con respuesta detectada por ELISPOT para IFN- γ . Se muestran el código de paciente, el alelo, la secuencia del epitope teórico, el "núcleo" de secuencia que aporta los residuos con interacciones más importantes, la afinidad teórica de la unión péptido-CMH y el rango porcentual en el que se ubica el epitope (cuanto más cercano a 0, mejor clasificación). Los triángulos destacan los epitopes con mayor capacidad de unión predicha, según los parámetros por defecto del programa NetMHCpan (umbral para unión débil: rango <2%; umbral para unión fuerte: rango <0,5%; ◀: unión débil; ◀◀: unión fuerte). Por practicidad, se limitaron los resultados mostrados a aquellos con rango $\leq 2,5\%$. (continúa en la página siguiente)

Paciente	Alelo	Pépt,	Pos,	Epitope	"Núcleo"	Afinidad (nM)	Rango (%)	
FA005	HLA-B*14:02	15	3	QWFLAGHPL	QWFLAGHPL	3703	0,7	◀
	HLA-B*14:02	15	4	WFLAGHPL	WF-LAGHPL	5979,1	1,4	◀
	HLA-B*14:02	15	2	CQWFLAGHPL	CQFLAGHPL	7937,8	2,5	
	HLA-B*14:02	15	5	FLAGHPLTNL	FLAGHPLTL	8513,8	2,5	
	HLA-B*39:03	15	2	CQWFLAGHPL	CQFLAGHPL	494,4	0,6	◀
	HLA-B*39:03	15	4	WFLAGHPL	W-FLAGHPL	783,3	0,8	◀
	HLA-B*39:03	15	3	QWFLAGHPL	QWFLAGHPL	885,6	0,9	◀
	HLA-B*39:03	15	5	FLAGHPLTNL	FLAGHPLTL	2192	2	◀
	HLA-C*07:02	15	3	QWFLAGHPL	QWFLAGHPL	2144,8	1,5	◀
	HLA-C*07:02	15	5	FLAGHPLTNL	FLAGHPLTL	3428,4	2,5	
	HLA-C*08:02	15	6	LAGHPLTNL	LAGHPLTNL	7402,6	1,5	◀
	HLA-C*08:02	15	5	FLAGHPLTNL	FLAGHPLTL	7813,1	1,6	◀
FA008	HLA-A*02:01	20	2	VVMEDGTLV	VVMEDGTLV	85,4	0,9	◀
	HLA-A*02:01	20	3	VMEDGTLVFPL	VMEDLVFPL	278,6	1,9	◀
	HLA-A*68:02	20	2	VVMEDGTLV	VVMEDGTLV	224,1	1,3	◀
	HLA-B*48:01	20	4	MEDGTLVFPL	MEDGLVFPL	3832,4	0,6	◀
	HLA-B*48:01	20	3	VMEDGTLVF	VMEDGTLVF	7879,8	1,4	◀
	HLA-C*08:01	20	3	VMEDGTLVF	VMEDGTLVF	338,6	0,25	◀◀
	HLA-C*08:01	20	2	VVMEDGTLV	VVMEDGTLV	1520,3	0,9	◀
	HLA-C*08:01	20	2	VVMEDGTLVF	VVMEDGTLVF	4234,4	2,5	
	HLA-C*08:02	20	3	VMEDGTLVF	VMEDGTLVF	432,7	0,09	◀◀
	HLA-C*08:02	20	2	VVMEDGTLV	VVMEDGTLV	5792,4	1,1	◀
	HLA-C*08:02	20	2	VVMEDGTLVF	VMEDGTLVF	6840,4	1,4	◀
FA031	HLA-A*02:01	38	3	FTLVATVTI	FTLVATVTI	240,3	1,8	◀
	HLA-A*03:01	38	7	ATVTIHQVPK	ATVTIHVPK	89,6	0,4	◀◀
	HLA-A*03:01	38	8	TVTIIHQVPK	TVTIIHQVPK	453,5	1,3	◀
	HLA-B*13:02	38	3	FTLVATVTI	FTLVATVTI	1785,4	0,4	◀◀
	HLA-B*13:02	38	2	RFTLVATVTI	RTLVATVTI	3276,6	1	◀
	HLA-C*06:02	38	1	HRFTLVATV	HRFTLVATV	62,9	0,02	◀◀
	HLA-C*06:02	38	1	HRFTLVATVTI	HRFTLVATI	2302,4	0,8	◀
	HLA-C*06:02	38	1	HRFTLVATVT	HRFTLVATV	5640,4	1,9	◀
	HLA-C*07:02	38	1	HRFTLVATV	HRFTLVATV	265,3	0,17	◀◀
RM45	HLA-B*40:01	20	4	MEDGTLVFPL	MEDGLVFPL	18,2	0,05	◀◀
	HLA-B*40:01	20	3	VMEDGTLVFPL	MEDGLVFPL	223,3	0,5	◀◀
	HLA-B*40:01	20	4	MEDGTLVFPLM	MEDGVFPLM	270,5	0,6	◀
	HLA-B*40:01	20	4	MEDGTLVF	ME-DGTLVF	680,9	0,9	◀
	HLA-B*53:01	20	2	VVMEDGTLVF	VVMEDTLVF	1592,7	1,2	◀
	HLA-B*53:01	20	3	VMEDGTLVF	VMEDGTLVF	2988,6	1,8	◀
	HLA-C*03:04	20	2	VVMEDGTLV	VVMEDGTLV	157,7	0,6	◀
	HLA-C*03:04	20	3	VMEDGTLVF	VMEDGTLVF	255,4	0,8	◀
	HLA-C*03:04	20	2	VVMEDGTLVF	VVMEDGTLVF	906,5	1,7	◀

Aproximación bioinformática al descubrimiento de epitopes de *T. cruzi* reconocidos por linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

	HLA-C*04:01	20	3	VMEDGTLVF	VMEDGTLVF	4085,6	0,09	◀◀
	HLA-C*04:01	20	2	VVMEDGTLVF	VMEDGTLVF	13256	1,5	◀
	HLA-A*31:01	47	4	RYQPYHSRHR	RYQPYHSHR	18.5	0.15	◀◀
	HLA-A*31:01	47	1	RQRRYQPYHSR	RQRRYQPYPYR	50.7	0.5	◀◀
	HLA-A*31:01	47	4	RYQPYHSRHRR	RYYHSRHRR	48.6	0.5	◀◀
	HLA-A*31:01	47	5	YQPYHSRHRR	YQYHSRHRR	89.8	0.8	◀
	HLA-A*31:01	47	4	RYQPYHSR	RYQPYHS-R	118.4	1	◀
	HLA-A*31:01	47	3	RRYQPYHSRHR	RYQPYHSHR	263.2	1.6	◀
	HLA-A*31:01	47	3	RRYQPYHSR	RRYQPYHSR	274.1	1.6	◀
	HLA-A*31:01	47	1	RQRRYQPYH	RQRRYQPYH	309.3	1.8	◀
RM46	HLA-C*05:01	38	3	FTLVATVTI	FTLVATVTI	3034,4	1,3	◀
	HLA-C*07:01	38	1	HRFTLVATV	HRFTLVATV	127,7	0,04	◀◀
	HLA-C*07:01	38	1	HRFTLVATVTI	HRFTATVTI	3040,5	1,1	◀
	HLA-C*07:01	38	3	FTLVATVTI	FTLVATVTI	6168,6	2,5	

Tabla 8

Predicción de epitopes en los péptidos reactivos utilizando información de las variantes de CMH de clase II (HLA-DR*B1, -DP*A1, -DP*B1, -DQ*A1, y -DQ*B1) expresadas por pacientes con respuesta detectada por ELISPOT para IFN- γ . Se muestran el código de paciente, el alelo (para el caso de HLA-DR*B1) o par de alelos en un complejo de CMH (es decir, un alelo *A1 para la cadena α , uno *B1 para la cadena β), la secuencia del epitope teórico, el “núcleo” de secuencia que aporta los residuos con interacciones más importantes, la afinidad teórica de la unión péptido-CMH y el rango porcentual en el que se ubica el epitope (cuanto más cercano a 0, mejor clasificación). Los triángulos destacan los epitopes con mayor capacidad de unión predicha, según los parámetros por defecto del programa NetMHCIIpan (umbral para unión débil: afinidad < 500 nM o rango < 2%; umbral para unión fuerte: afinidad < 50 nM o rango < 0.5%; ◀: unión débil; ◀◀: unión fuerte; continúa en las dos páginas siguientes).

Pcte.	Alelo(s)	Pépt	Secuencia	“Núcleo”	Afinidad (nM)	Rango (%)	
FA005	DRB1_0404	15	ECQWFLAGHPLTNLS	FLAGHPLTN	156,88	8	◀
	DRB1_1503	15	ECQWFLAGHPLTNLS	FLAGHPLTN	135,33	9,5	◀
	HLA-DPA10103-DPB10401	15	ECQWFLAGHPLTNLS	LAGHPLTNL	242,1	12	
	HLA-DPA10103-DPB11801	15	ECQWFLAGHPLTNLS	LAGHPLTNL	46,28	15	◀◀
	HLA-DQA10102-DQB10302	15	ECQWFLAGHPLTNLS	LAGHPLTNL	781,43	25	
	HLA-DQA10102-DQB10602	15	ECQWFLAGHPLTNLS	LAGHPLTNL	558,61	27	
	HLA-DQA10301-DQB10302	15	ECQWFLAGHPLTNLS	WFLAGHPLT	2142,32	30	
	HLA-DQA10301-DQB10602	15	ECQWFLAGHPLTNLS	LAGHPLTNL	678,64	25	
FA008	DRB1_0102	20	GVVMEDGTLVFPLMA	VVMEDGTLV	66,59	38	◀
	DRB1_0802	20	GVVMEDGTLVFPLMA	GTLVFPLMA	2345,71	55	
	HLA-DPA10103-DPB10901	20	GVVMEDGTLVFPLMA	EDGTLVFPL	114,43	23	◀
	HLA-DPA10103-DPB110501	20	GVVMEDGTLVFPLMA	DGTLVFPLM	706,57	34	
	HLA-DPA10105-DPB10901	20	GVVMEDGTLVFPLMA	EDGTLVFPL	114,43	23	◀
	HLA-DPA10105-DPB110501	20	GVVMEDGTLVFPLMA	DGTLVFPLM	706,57	34	
	HLA-DQA10101-DQB10302	20	GVVMEDGTLVFPLMA	GTLVFPLMA	460,65	8,5	◀

Aproximación bioinformática al descubrimiento de epitopes de *T. cruzi* reconocidos por linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

	HLA-DQA10101-DQB10501	20	GVVMEDGTLVFPLMA	VMEDGTLVF	1814,12	21	
	HLA-DQA10301-DQB10302	20	GVVMEDGTLVFPLMA	EDGTLVFPL	893,42	11	
	HLA-DQA10301-DQB10501	20	GVVMEDGTLVFPLMA	EDGTLVFPL	2252,57	18	
FA0031	DRB1_0701	38	HRFTLVATVTIHQVP	FTLVATVTI	28,09	1,3	◀◀
	DRB1_0701	5	ENQLYHFANYKFTLV	LYHFANYKF	34,01	1,9	◀◀
	DRB1_0701	10	TVPYHFANSKFTLVA	YHFANSKFT	35,65	2	◀◀
	DRB1_0701	38	RFTLVATVTIHQVPK	FTLVATVTI	38,13	2,5	◀◀
	DRB1_0701	16	MLSLVAAVKAPRTHN	VAAVKAPRT	64,84	5,5	◀
	DRB1_1501	5	ENQLYHFANYKFTLV	LYHFANYKF	37,89	0,9	◀◀
	DRB1_1501	16	MLSLVAAVKAPRTHN	LVAAVKAPR	93,63	5	◀
	DRB1_1501	10	TVPYHFANSKFTLVA	YHFANSKFT	99,96	5,5	◀
	DRB1_1501	38	HRFTLVATVTIHQVP	LVATVTIHQ	148,33	9,5	◀
	DRB1_1501	38	RFTLVATVTIHQVPK	LVATVTIHQ	181,55	12	◀
	HLA-DPA10103-DPB10401	5	ENQLYHFANYKFTLV	FANYKFTLV	20,13	0,8	◀◀
	HLA-DPA10103-DPB10401	10	TVPYHFANSKFTLVA	FANSKFTLV	32,66	1,6	◀◀
	HLA-DPA10103-DPB10401	38	HRFTLVATVTIHQVP	VATVTIHQV	738,08	25	
	HLA-DPA10103-DPB10401	38	RFTLVATVTIHQVPK	VATVTIHQV	884,63	27	
	HLA-DPA10103-DPB10401	16	MLSLVAAVKAPRTHN	VAAVKAPRT	4336,22	60	
	HLA-DPA10103-DPB10402	5	ENQLYHFANYKFTLV	FANYKFTLV	14,94	0,7	◀◀
	HLA-DPA10103-DPB10402	10	TVPYHFANSKFTLVA	FANSKFTLV	21,59	1,4	◀◀
	HLA-DPA10103-DPB10402	38	HRFTLVATVTIHQVP	VATVTIHQV	298,37	21	◀
	HLA-DPA10103-DPB10402	38	RFTLVATVTIHQVPK	VATVTIHQV	368,83	24	◀
	HLA-DPA10103-DPB10402	16	MLSLVAAVKAPRTHN	VAAVKAPRT	1512,43	49	
	HLA-DQA10102-DQB10202	38	HRFTLVATVTIHQVP	LVATVTIHQ	1915,62	20	
	HLA-DQA10102-DQB10202	38	RFTLVATVTIHQVPK	LVATVTIHQ	2178,12	24	
	HLA-DQA10102-DQB10202	5	ENQLYHFANYKFTLV	LYHFANYKF	2484,05	28	
	HLA-DQA10102-DQB10202	10	TVPYHFANSKFTLVA	FANSKFTLV	4830,5	55	
	HLA-DQA10102-DQB10202	16	MLSLVAAVKAPRTHN	LVAAVKAPR	5581,03	60	
	HLA-DQA10102-DQB10602	38	HRFTLVATVTIHQVP	VATVTIHQV	106,34	3,5	◀
	HLA-DQA10102-DQB10602	38	RFTLVATVTIHQVPK	VATVTIHQV	145,28	5,5	◀
	HLA-DQA10102-DQB10602	16	MLSLVAAVKAPRTHN	LSLVAAVKA	155,49	6,5	◀
	HLA-DQA10102-DQB10602	10	TVPYHFANSKFTLVA	ANSKFTLVA	993,13	42	
	HLA-DQA10102-DQB10602	5	ENQLYHFANYKFTLV	FANYKFTLV	2006,12	65	

Aproximación bioinformática al descubrimiento de epitopes de *T. cruzi* reconocidos por linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

	HLA-DQA10201-DQB10202	38	HRFTLVATVTIHQVP	FTLVATVTI	3771,08	26	
	HLA-DQA10201-DQB10202	38	RFTLVATVTIHQVPK	FTLVATVTI	4327,17	31	
	HLA-DQA10201-DQB10202	5	ENQLYHFANYKFTLV	LYHFANYKF	6287,16	46	
	HLA-DQA10201-DQB10202	16	MLSLVAAVKAPRTHN	VAAVKAPRT	7536,86	55	
	HLA-DQA10201-DQB10202	10	TVPYHFANSKFTLVA	FANSKFTLV	8997,6	65	
	HLA-DQA10201-DQB10602	38	HRFTLVATVTIHQVP	TLVATVTIH	169,23	8	◀
	HLA-DQA10201-DQB10602	16	MLSLVAAVKAPRTHN	SLVAAVKAP	173,5	8,5	◀
	HLA-DQA10201-DQB10602	38	RFTLVATVTIHQVPK	TLVATVTIH	230,54	13	◀
	HLA-DQA10201-DQB10602	10	TVPYHFANSKFTLVA	ANSKFTLVA	1150,05	60	
	HLA-DQA10201-DQB10602	5	ENQLYHFANYKFTLV	YHFANYKFT	1845,68	75	
RM45	DRB1_0102	47	RQRRYQPYHSRHRRL	YQPYHSRHR	65,94	38	◀
	DRB1_0102	20	GVVMEDGTLVFPLMA	VVMEDGTLV	66,59	38	◀
	DRB1_0404	20	GVVMEDGTLVFPLMA	VVMEDGTLV	830,31	38	
	DRB1_0404	47	RQRRYQPYHSRHRRL	YQPYHSRHR	996,66	43	
	HLA-DPA10103-DPB10501	47	RQRRYQPYHSRHRRL	QPYHSRHR	1482,99	29	
	HLA-DPA10103-DPB10501	20	GVVMEDGTLVFPLMA	DGTLVFPLM	2166,16	37	
	HLA-DPA10201-DPB10501	47	RQRRYQPYHSRHRRL	QPYHSRHR	1560,86	32	
	HLA-DPA10201-DPB10501	20	GVVMEDGTLVFPLMA	DGTLVFPLM	2140,02	39	
	HLA-DQA10101-DQB10302	20	GVVMEDGTLVFPLMA	GTLVFPLMA	460,65	8,5	◀
	HLA-DQA10101-DQB10302	20	GVVMEDGTLVFPLMA	GTLVFPLMA	460,65	8,5	◀
	HLA-DQA10101-DQB10302	47	RQRRYQPYHSRHRRL	QRRYQPYHS	14712,3	95	
	HLA-DQA10101-DQB10302	47	RQRRYQPYHSRHRRL	QRRYQPYHS	14712,3	95	
	HLA-DQA10101-DQB10501	20	GVVMEDGTLVFPLMA	VMEDGTLVF	1814,12	21	
	HLA-DQA10101-DQB10501	47	RQRRYQPYHSRHRRL	YQPYHSRHR	16979,6	90	
	HLA-DQA10301-DQB10302	20	GVVMEDGTLVFPLMA	EDGTLVFPL	893,42	11	
	HLA-DQA10301-DQB10302	47	RQRRYQPYHSRHRRL	QRRYQPYHS	22192,1	95	
	HLA-DQA10301-DQB10501	20	GVVMEDGTLVFPLMA	EDGTLVFPL	2252,57	18	
	HLA-DQA10301-DQB10501	47	RQRRYQPYHSRHRRL	YQPYHSRHR	14465,4	90	
RM46	DRB1_0405	38	HRFTLVATVTIHQVP	FTLVATVTI	51,5	1,4	◀
	DRB1_0405	38	RFTLVATVTIHQVPK	LVATVTIHQ	69,14	2,5	◀
	DRB1_0701	38	HRFTLVATVTIHQVP	FTLVATVTI	28,09	1,3	◀◀
	DRB1_0701	38	RFTLVATVTIHQVPK	FTLVATVTI	38,13	2,5	◀◀
	HLA-DPA10103-DPB10301	38	HRFTLVATVTIHQVP	VATVTIHQV	40,18	9,5	◀◀

Aproximación bioinformática al descubrimiento de epitopes de *T. cruzi* reconocidos por linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

HLA-DPA10103-DPB10301	38	RFTLVATVTIHQVPK	VATVTIHQV	51,77	12	◀
HLA-DPA10103-DPB110401	38	HRFTLVATVTIHQVP	VATVTIHQV	40,18	9,5	◀◀
HLA-DPA10103-DPB110401	38	RFTLVATVTIHQVPK	VATVTIHQV	51,77	12	◀
HLA-DQA10201-DQB10202	38	HRFTLVATVTIHQVP	FTLVATVTI	3771,08	26	
HLA-DQA10201-DQB10202	38	RFTLVATVTIHQVPK	FTLVATVTI	4327,17	31	
HLA-DQA10201-DQB10302	38	HRFTLVATVTIHQVP	VATVTIHQV	595,91	14	
HLA-DQA10201-DQB10302	38	RFTLVATVTIHQVPK	VATVTIHQV	864,69	22	
HLA-DQA10303-DQB10202	38	HRFTLVATVTIHQVP	FTLVATVTI	4534,23	25	
HLA-DQA10303-DQB10202	38	RFTLVATVTIHQVPK	VATVTIHQV	5071,63	30	
HLA-DQA10303-DQB10302	38	HRFTLVATVTIHQVP	VATVTIHQV	1563,94	22	
HLA-DQA10303-DQB10302	38	RFTLVATVTIHQVPK	VATVTIHQV	2067,91	30	

5.2. Discusión

5.2.1. Utilidad de la aproximación predictiva por redes neuronales al descubrimiento de epitopes T de *T. cruzi*

Dentro del proteoma de un patógeno, la selección de los epitopes que son presentados a los linfocitos T está influenciada por un conjunto de parámetros de los mecanismos asociados a la presentación antigénica. Algunos autores proponen que las propiedades del antígeno relacionadas a su procesamiento, como la estructura terciaria (Carmicle et al., 2007) y la susceptibilidad de sus secuencias adyacentes a la acción de las proteasas de la célula presentadora (Godkin et al., 2001), son los principales determinantes de la selección de péptidos presentados. Otros autores sugieren un modelo intrínseco del péptido, arguyendo que la carga del péptido en el CMH y la estabilidad cinética de su unión dirigen la jerarquía de inmunodominancia (Sant et al., 2007). Nuestra aproximación está basada en este último modelo, puesto que su principio de funcionamiento asume (i) que la afinidad por los distintos CMH estudiados mantiene una relación directa con la probabilidad de que un péptido sea presentado y (ii) que los patrones que favorecen la presentación de unas secuencias por sobre otras están implícitos en su propia secuencia. Cabe destacar que los métodos NetMHCPan y NetMHCIIpan son considerados el “estado del arte” actualmente, puesto que su *performance*, según estudios comparativos, es superior a la de otros métodos de predicción de epitopes (Oyarzun y Kobe, 2015). Gran parte de su poder predictivo se basa en el aprovechamiento de información empírica para alimentar redes neuronales artificiales y así encontrar motivos que favorecen la presentación peptídica en el contexto del CMH, a diferencia de varios métodos alternativos que se basan en una aproximación de contribución individual aditiva de los residuos en una secuencia.

Dos factores accesorios a esta búsqueda son necesarios para mejorar sustancialmente la calidad de los resultados del *pipeline* aplicado en este trabajo, y tienen que ver con la información con la que se alimentan los algoritmos de predicción: el primero es un estudio comprehensivo de la prevalencia de alelos de HLA de clases I y II de la población que habita en zonas donde la enfermedad de Chagas es endémica. Como se señaló en la Introducción de esta Tesis, la segregación étnica es un factor estructural que afecta fuertemente a la epidemiología de esta enfermedad. En ese sentido, estos conjuntos poblacionales suelen quedar excluidos o sub-representados en

estudios como los de tipificación genética de estos alelos. En consecuencia, la utilización de datos de prevalencia a nivel de América Latina para los alelos de CMH clase I, y más todavía, de prevalencia a nivel global para alelos de CMH clase II, a pesar de ser la mejor elección posible en función de la disponibilidad de información al respecto, dista sensiblemente de ser la situación óptima. El segundo de estos factores es un aumento en la cantidad de datos de estudios de proteómica disponibles. Si bien es posible inferir secuencias proteicas a partir de las secuencias genómicas depositadas en TriTrypDB, las peculiaridades de la biología molecular del parásito, en particular el alto grado de repetitividad de secuencias y la presencia de grandes familias de genes homólogos como la de las trans-sialidasas, comprometen la confianza con la que dicha conversión puede llevarse a cabo. Además, actualmente solo hay 2 cepas con secuenciación completa de genoma. Asumiendo que la variabilidad genética del parásito tiene relevancia a nivel de la respuesta inmune y la variabilidad antigénica, la aproximación predictiva se beneficiaría de la secuenciación de más cepas de *T. cruzi*, en especial de aquellas derivadas de clones con relevancia clínica.

Para que sea factible el estudio de la respuesta de los linfocitos T frente a patógenos del nivel de complejidad que *T. cruzi* presenta, resulta imprescindible reducir el universo de la búsqueda de epitopes a un número de candidatos manejable a escala de laboratorio. Nuestro enfoque logró, mediante el filtrado y la jerarquización de secuencias, seleccionar un conjunto limitado a 50 péptidos a partir de las decenas de miles posibles dentro de las 53 proteínas del parásito anotadas en IEDB. En ese sentido, los resultados obtenidos pueden considerarse como una prueba de concepto exitosa, con miras a aplicar la misma aproximación sobre un conjunto de proteínas más amplio.

5.2.2. Propiedades de la respuesta observada frente a los péptidos predichos.

A partir del estudio de la respuesta por secreción de IFN- γ contra las mezclas de péptidos y su posterior deconvolución, se detectó que 7 de las 50 secuencias evaluadas contienen epitopes que activan la respuesta T en muestras de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Esta respuesta es, con toda probabilidad, reflejo de especificidades propias de la memoria inmunológica generada por la infección: por un lado, sólo se observó secreción de IFN- γ frente a los péptidos en pacientes que también respondieron frente al lisado total del parásito. Por otro lado, ninguno de los sujetos del grupo control mostró un nivel importante de activación frente a las mezclas de péptido, implicando que

la infección por *T. cruzi* es un requisito necesario para la selección de linfocitos T con las especificidades evaluadas. No obstante, algunos pocos individuos del grupo control mostraron un incremento leve, aunque cuantificable, de UFS en el desafío frente a las mezclas de péptidos que contrasta con la ausencia de respuesta específica contra lisado del parásito. Una posible explicación a este fenómeno es la existencia de linfocitos T de memoria específicos contra antígenos no relacionados con *T. cruzi* que presentan una reactividad cruzada con los epitopes ensayados. Esta hipótesis concuerda con los resultados obtenidos durante la generación de líneas de linfocitos T específicos contra el parásito a partir de poblaciones purificadas de linfocitos T CD4⁺ de memoria.

En cuanto a la inmunodominancia de los péptidos estudiados en este trabajo, la comparación para un mismo sujeto entre la respuesta frente a un péptido con la generada frente al lisado total del parásito mostró una gama diversa de la representatividad de las células específicas contra estos epitopes particulares. Asimismo, fue interesante observar que, para un número no menor de pacientes, el recuento de UFS fue mayor en la condición de desafío frente al péptido que en la de desafío con antígenos del parásito. Esto podría deberse a una baja representación en el parásito del antígeno correspondiente, lo cual llevaría a una concentración sub-saturante del epitope en cuestión en el experimento de ELISPOT. De todas formas, la aproximación utilizada para evaluar inmunodominancia es limitada y solamente estimativa. Una evaluación más apropiada requiere de una mejora en la sensibilidad del método de marcación intracitoplasmática de IFN- γ con el que contamos a la fecha.

Es interesante notar que, a pesar de que uno de los criterios empleados para la selección de los péptidos a evaluar fue la promiscuidad de afinidad por variantes polimórficas de CMH, la diferencia en la respuesta entre los distintos pacientes, sumada al hecho de que la mayoría de los pacientes (92%) respondió frente a un único péptido o ninguno, sugieren que estos epitopes están fuertemente restringidos por el CMH, al menos dentro de la cohorte de participantes en este estudio.

En cuanto al perfil de las células activadas por estos epitopes, hemos demostrado que para 6 de los 7 péptidos, la respuesta observada es predominantemente atribuible a los linfocitos T CD4⁺, aunque el método utilizado no permite descartar por completo una contribución de la población CD8⁺ a la señal cuantificada. Para el caso de la respuesta del paciente FA008

Aproximación bioinformática al descubrimiento de epitopes de *T. cruzi* reconocidos por linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

con el péptido #20, a la que corresponde el mayor valor de UFS observado durante los ensayos de desafío con un único péptido, esta característica se confirmó mediante marcación intracitoplasmática de IFN- γ y citometría de flujo. El mismo experimento permitió además verificar que la mayoría de las células productoras de citoquina pertenecieron a la población T_{CM}. En función de esto, y dada la capacidad de auto-renovación, así como la de generar linfocitos T efectores por diferenciación que definen a este tipo celular (Sallusto et al., 2004; Lanzavecchia y Sallusto, 2005; Koch et al., 2008), puede decirse que el epitope contenido en el péptido #20 genera una respuesta T CD4⁺ de memoria que, al menos en este paciente, se mantiene a largo plazo.

La predicción de epitopes en base a las variantes alélicas de HLA expresadas por los algunos pacientes con respuesta frente a los péptidos apunta en la misma dirección: los péptidos para los que se observó una secreción de IFN- γ asociada principalmente a los linfocitos T CD4⁺, para un determinado paciente, contienen secuencias con alta afinidad predicha por moléculas de CMH clase II expresadas por ese mismo paciente. En concordancia, se predijeron epitopes de unión fuerte a variantes de CMH de clase I expresadas por el paciente RM45, para el cual se observó una respuesta con fuerte predominancia de los linfocitos T CD8⁺ en ensayo de ELISPOT. Estos resultados ponen en relieve el poder predictivo de los algoritmos utilizados en esta aproximación.

En este punto, cabe mencionar que al día de hoy los únicos epitopes de *T. cruzi* activadores de linfocitos T colaboradores humanos depositados en la IEDB corresponden a secuencias del antígeno B13 con restricción por los alelos HLA-DQA1*05:01, encontradas mediante el uso de barrido con péptidos solapados (Abel et al., 2005; Iwai et al., 2005). Esto pone en relieve el valor de la información aportada por nuestros resultados.

5.2.3. Perspectivas.

En función de los resultados obtenidos mediante la validación de la estrategia predictiva planteada, se abren diferentes posibilidades a explorar a futuro.

Por un lado, resulta de interés expandir la predicción de epitopes a proteínas por fuera de las incluidas en este estudio (cuya antigenicidad ya había sido estudiada, en mayor o menor medida). Si bien nuestros resultados son interesantes desde el punto de vista de la descripción, dentro de proteínas de

Aproximación bioinformática al descubrimiento de epitopes de *T. cruzi* reconocidos por linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

antigenicidad demostrada, de las secuencias capaces de establecer una respuesta de memoria específica, resulta atractivo el uso de nuestra metodología para la exploración del conjunto de antígenos de *T. cruzi* que aún desconocemos.

Por otro lado, sería interesante caracterizar completamente la expresión de alelos de HLA de nuestra muestra poblacional. Conocer la diversidad de CMH en la población de estudio permitiría hacer una búsqueda predictiva orientada a las variantes de este locus con relevancia epidemiológica. Como ya se discutió anteriormente, es de interés especial para la aplicación de esta estrategia predictiva disponer de datos exhaustivos sobre la prevalencia de variantes de HLA de las distintas poblaciones residentes en zona endémica. Una ventaja adicional sobre esta información sería su potencial aplicación al diseño de un candidato vacunal que contenga epitopes dirigidos a cubrir todas las variantes de CMH expresadas en la población afectada. Para esto, sería especialmente útil conocer los alelos presentes en aquellos pacientes cuyas células mostraron una respuesta específica contra el parásito, pero que no reaccionaron frente a ninguno de los péptidos evaluados.

Finalmente, y en relación con el último punto, es necesario evaluar las capacidades funcionales de las células de los pacientes que responden frente a estos epitopes. En principio, nuestros resultados no sugieren asociación entre la presencia de estas células y sintomatología cardíaca, dado que los pacientes que responden a cada uno de los péptidos están equitativamente distribuidos entre ambos grupos clínicos, o son demasiado pocos como para concluir al respecto. Sin embargo, estudiar su perfil de secreción de citoquinas, así como sus características fenotípicas, permitiría entender su posible rol protector o patogénico en el contexto de la infección crónica.

6. Conclusión

En este trabajo de Tesis se ha abordado el estudio de la respuesta mediada por linfocitos T en el contexto de la infección crónica por *T. cruzi* mediante dos aproximaciones complementarias.

Una de ellas consistió en el desarrollo de un protocolo optimizado para la expansión *ex vivo* de linfocitos T patógeno-específicos a partir de muestras de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Al respecto, se demostró que la estimulación inicial de las células es crucial para la expansión selectiva de linfocitos T de memoria relacionados con la infección. Utilizando CMN totales como población de partida, se comprobó que tiempos más largos de estimulación con lisado de parásito favorecen la activación de linfocitos T *naïve*, y resultan contraproducentes cuando el objetivo es el estudio de la memoria inmunológica generada *in vivo*. De igual manera, se mostró que partir de linfocitos T CD4⁺ de memoria purificados permite aumentar la duración de la estimulación inicial, y que un estímulo inicial con lisado del parásito, a diferencia de un estímulo inicial más potente pero inespecífico (PHA), beneficia la expansión de poblaciones específicas, mejorando la selectividad del proceso y favoreciendo el establecimiento de líneas celulares con especificidad estable en el tiempo. Adicionalmente, se verificó que las B-LCL autólogas pre-cargadas con lisado del parásito durante 18 h son útiles como CPA en experimentos de presentación antigénica *in vitro*. En cuanto a los métodos de detección de respuesta específica, se determinó que la proliferación celular es útil sólo durante los primeros meses del cultivo *in vitro*, puesto que, en líneas policlonales de linfocitos T, este tipo de respuesta se había perdido al día 113 desde el estímulo inicial. En ese sentido, se observó que la secreción de IFN- γ

es un parámetro más estable en el tiempo, y que la secreción de GM-CSF también permite la detección de respuesta específica frente al lisado de *T. cruzi*. En adición a estas dos citoquinas, los resultados observados por proliferación celular, así como la medida de otras citoquinas por el método de *multiplex*, sugieren que el uso de múltiples parámetros de detección de respuesta permitiría maximizar el número y la diversidad funcional de los cultivos de linfocitos T específicos detectados.

La segunda aproximación se basó en el uso de herramientas bioinformáticas predictivas para la selección de secuencias de *T. cruzi* con alta inmunogenicidad teórica y su posterior validación *in vitro*. Mediante este esquema de trabajo hemos logrado identificar 7 secuencias del parásito que activan la secreción de IFN- γ en linfocitos T de pacientes con enfermedad de Chagas crónica, hecho que implica que constituyen o contienen epitopes frente a los cuales se genera memoria inmunológica *in vivo* en el marco de la infección. Cuatro de estos epitopes son completamente novedosos y la mayoría de ellos mostró una contribución predominante de la población CD4⁺ a la respuesta inducida. Asimismo, se predijo la unión de los péptidos a las moléculas de CMH expresadas por algunos pacientes con respuesta detectada frente a los mismos, verificándose un alto grado de concordancia entre los resultados de los métodos predictivos y el perfil de la respuesta observada por ELISPOT. A pesar de la limitación impuesta por la sensibilidad del método de marcación intracitoplasmática de citoquinas, se logró comprobar para uno de los pacientes que la secreción de IFN- γ observada por ELISPOT es atribuible principalmente a la población de linfocitos T_{CM} CD4⁺, lo cual indica que el epítopo en cuestión es capaz de establecer memoria inmunológica a largo plazo. Para la totalidad del conjunto de péptidos se observaron grados diversos de inmunodominancia aparente. Ni la presencia de células específicas para alguno de los epitopes ni el grado de representación de la respuesta frente a un péptido en particular en la respuesta frente al lisado total mostraron relación con la presencia o ausencia de patología cardíaca.

Una característica común a ambas aproximaciones que aporta un valor especial a los resultados obtenidos es el uso de muestras de pacientes para el estudio de la memoria inmunológica. En ese sentido, los epitopes encontrados por predicción bioinformática y luego validados *in vitro*, así como aquellos que pudieran surgir de la elucidación de la especificidad de líneas clonales de linfocitos T de pacientes, son por definición inmunogénicos en humanos,

independientemente de la posible existencia de restricción por HLA. De esta forma, quedan exentos de la necesidad de validación en otros modelos experimentales. Sin embargo, es importante a futuro determinar su relevancia en la contención de la infección, así como en la patogénesis de la enfermedad de Chagas. Para el estudio de estos factores, podrían ser de utilidad el uso de modelos animales humanizados que expresan variantes de HLA relevantes a este estudio y el desarrollo de estudios longitudinales con seguimiento de pacientes.

Es interesante proyectar la interacción entre ambas líneas de investigación, de manera de obtener un conocimiento integral sobre los factores determinantes de la presentación antigénica y la especificidad T. Por ejemplo, la secuenciación del RCT a partir de líneas clonales de linfocitos T generadas por estimulación con epitopes identificados por el método predictivo posibilitaría la identificación y caracterización de los tres actores que establecen la especificidad en la sinapsis inmunológica entre el linfocito T y la CPA: RCT, péptido, CMH. El análisis de estas tríadas permitiría conocer los componentes elementales que dirigen las interacciones entre estas moléculas y la selección de linfocitos T específicos, y contribuiría además al desarrollo de estrategias predictivas más poderosas.

Más allá del valor intrínseco de las herramientas y el conocimiento científico generados mediante este trabajo, es interesante considerar su utilidad en el largo plazo, como contribución al potencial desarrollo de estrategias profilácticas y/o terapéuticas que impacten directamente sobre la epidemiología y la clínica de la enfermedad de Chagas. En ese sentido, es de relevancia estratégica entender los factores y mecanismos que determinan la especificidad de la memoria inmunológica frente a la infección por *T. cruzi*, descifrar las razones que limitan su eficacia en la eliminación del parásito, y establecer el rol de los actores en el desarrollo de los procesos inflamatorios que llevan a los distintos cuadros patológicos. Los resultados obtenidos contribuyen, ya sea mediante la descripción de nuevos epitopes o por la generación de nuevas herramientas metodológicas, al conocimiento sobre la memoria inmunológica mediada por linfocitos T CD4⁺ en el contexto de la enfermedad de Chagas. Este campo de investigación ha sido escasamente explorado hasta el momento, por lo que la relevancia de estas células en relación con su especificidad y su diversidad funcional, tanto en la protección como en la patogénesis, son puntos estratégicos que requieren ser explorados en mayor profundidad.

7. Bibliografía

- Abbas, Abul K, Andrew H Lichtman, and Shiv Pillai. 2012. Cellular and Molecular Immunology. 7th ed. Elsevier.
- Abel, Lúcia C J, Leo K. Iwai, Wladia Viviani, Angelina M. Bilate, Kellen C. Fá, Renata C. Ferreira, Anna C. Goldberg, et al. 2005. “T Cell Epitope Characterization in Tandemly Repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 Protein.” *Microbes and Infection* 7: 1184–95. doi:10.1016/j.micinf.2005.03.033.
- Acosta Rodriguez, E. V., E. I. Zuniga, C. L. Montes, M. C. Merino, D. A. Bermejo, Maria Carolina Amezcua Vesely, C. C. Motran, and A. Gruppi. 2007. “*Trypanosoma cruzi* Infection Beats the B-Cell Compartment Favouring Parasite Establishment: Can We Strike First?” *Scandinavian Journal of Immunology* 66 (2–3): 137–42. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.01968.x.
- Ahmed, Raya, Laureline Roger, Pedro Costa del Amo, Kelly L. Miners, Rhiannon E. Jones, Lies Boelen, Tinhinane Fali, et al. 2016. “Human Stem Cell-like Memory T Cells Are Maintained in a State of Dynamic Flux.” *Cell Reports* 17 (11). ElsevierCompany.: 2811–18. doi:10.1016/j.celrep.2016.11.037.
- Albareda, María C., Ana M. De Rissio, Gonzalo Tomas, Alicia Serjan, María G. Alvarez, Rodolfo Viotti, Laura E. Fichera, et al. 2013. “Polyfunctional T Cell Responses in Children in Early Stages of Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection Contrast with Monofunctional Responses of Long-Term Infected Adults.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (12). doi:10.1371/journal.pntd.0002575.
- Albareda, María Cecilia, Susana Adriana Laucella, María Gabriela Alvarez, Alejandro Hector Armenti, Graciela Bertochi, Rick L. Tarleton, and Miriam Postan. 2006.

- “*Trypanosoma cruzi* Modulates the Profile of Memory CD8+ T Cells in Chronic Chagas’ Disease Patients.” *International Immunology* 18 (3): 465–71. doi:10.1093/intimm/dxh387.
- Albareda, María Cecilia, Gabriela Carina Olivera, Susana a Laucella, María Gabriela Alvarez, Esteban Rodrigo Fernandez, Bruno Lococo, Rodolfo Viotti, Rick L Tarleton, and Miriam Postan. 2009. “Chronic Human Infection with *Trypanosoma cruzi* Drives CD4+ T Cells to Immune Senescence.” *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 183 (6): 4103–8. doi:10.4049/jimmunol.0900852.
- Almeida, I C, S R Milani, P A Gorin, and Luiz R Travassos. 1991. “Complement-Mediated Lysis of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes by Human Anti-Alpha-Galactosyl Antibodies.” *Journal of Immunology* 146 (7): 2394–2400. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1706399>.
- Alvarez, María G., Graciela L. Bertocchi, Gretchen Cooley, María C. Albareda, Rodolfo Viotti, Damián E. Perez-Mazliah, Bruno Lococo, Melisa Castro Eiro, Susana A. Laucella, and Rick L. Tarleton. 2016. “Treatment Success in *Trypanosoma cruzi* Infection Is Predicted by Early Changes in Serially Monitored Parasite-Specific T and B Cell Responses.” *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10 (4): e0004657. doi:10.1371/journal.pntd.0004657.
- Alvarez, María G., Miriam Postan, D. Brent Weatherly, Maria C. Albareda, John Sidney, Alessandro Sette, Carina Olivera, et al. 2008. “HLA Class I-T Cell Epitopes from Trans-Sialidase Proteins Reveal Functionally Distinct Subsets of CD8+ T Cells in Chronic Chagas Disease.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2 (9). doi:10.1371/journal.pntd.0000288.
- Anderson, Ana C., Nicole Joller, and Vijay K. Kuchroo. 2016. “Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-Inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation.” *Immunity* 44 (5). Elsevier Inc.: 989–1004. doi:10.1016/j.immuni.2016.05.001.
- Annunziato, Francesco, and Sergio Romagnani. 2009. “Heterogeneity of Human Effector CD4+ T Cells.” *Arthritis Research & Therapy* 11 (6): 257. doi:10.1186/ar2843.
- Appay, Victor, Rene A. W. Van Lier, Federica Sallusto, and Mario Roederer. 2008. “Phenotype and Function of Human T Lymphocyte Subsets: Consensus and Issues.” *Cytometry Part A* 73 (11): 975–83. doi:10.1002/cyto.a.20643.

- Argüello, Rafael J., María C. Albareda, María G. Alvarez, Graciela Bertocchi, Alejandro H. Armenti, Carlos Vigliano, Patricia C. Meckert, Rick L. Tarleton, and Susana A. Laucella. 2012. "Inhibitory Receptors Are Expressed by *Trypanosoma cruzi*-Specific Effector T Cells and in Hearts of Subjects with Chronic Chagas Disease." *PLoS ONE* 7 (5). doi:10.1371/journal.pone.0035966.
- Batalla, Estela I., Agustina M. Pino Martínez, Carolina V. Poncini, Tomás Duffy, Alejandro G. Schijman, Stella M. González Cappa, and Catalina D Alba Soto. 2013. "Impairment in Natural Killer Cells Editing of Immature Dendritic Cells by Infection with a Virulent *Trypanosoma cruzi* Population." *Journal of Innate Immunity* 5 (5): 494–504. doi:10.1159/000350242.
- Ben Younes-Chennoufi, A, G Said, H Eisen, A Durand, and M Hontebeyrie-Joskowicz. 1988. "Cellular Immunity to *Trypanosoma cruzi* Is Mediated by Helper T Cells (CD4+)." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82 (1): 84–89. doi:10.1016/0035-9203(88)90271-4.
- Bermejo, Daniela A., Maria Carolina Amezcua Vesely, Mahmood Khan, Eva V. Acosta Rodriguez, Carolina L. Montes, Maria Carolina Amezcua Vesely, Kai Michael Toellner, et al. 2011. "*Trypanosoma cruzi* Infection Induces a Massive Extrafollicular and Follicular Splenic B-Cell Response Which Is a High Source of Non-Parasite-Specific Antibodies." *Immunology* 132 (1): 123–33. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03347.x.
- Bermejo, Daniela a, Shaun W Jackson, Melisa Gorosito-Serran, Eva V Acosta-Rodriguez, Maria C Amezcua-Vesely, Blythe D Sather, Akhilesh K Singh, et al. 2013. "*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." *Nature Immunology* 14 (5): 514–22. doi:10.1038/ni.2569.
- Bern, Caryn. 2015. "Chagas' Disease." *New England Journal of Medicine* 373 (5): 456–66. doi:10.1056/NEJMra1410150.
- Bettelli, Estelle, Thomas Korn, Mohamed Oukka, and Vijay K. Kuchroo. 2008. "Induction and Effector Functions of TH17 Cells." *Nature* 453 (7198): 1051–57. doi:10.1038/nature07036.
- Bonney, Kevin M., and David M. Engman. 2015. "Autoimmune Pathogenesis of Chagas Heart Disease: Looking Back, Looking Ahead." *American Journal of Pathology* 185 (6). Elsevier: 1537–47. doi:10.1016/j.ajpath.2014.12.023.

- Borges, Margarida, Anabela Cordeiro Da Silva, Denis Sereno, and Ali Ouaiissi. 2003. "Peptide-Based Analysis of the Amino Acid Sequence Important to the Immunoregulatory Function of *Trypanosoma cruzi* Tc52 Virulence Factor." *Immunology* 109 (1): 147–55. doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01637.x.
- Brodskyn, Claudia, Julie Patricio, Rubem Oliveira, Lucas Lobo, Andrea Arnholdt, Lucia Mendonça-previato, Aldina Barral, and Manoel Barral-netto. 2002. "Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* Interfere with Macrophages and Dendritic Cell Responses." *Society* 70 (7): 3736–43. doi:10.1128/IAI.70.7.3736.
- Bryan, Marianne A., Siobhan E. Guyach, and Karen A. Norris. 2010. "Specific Humoral Immunity versus Polyclonal B Cell Activation in *Trypanosoma cruzi* Infection of Susceptible and Resistant Mice." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (7). doi:10.1371/journal.pntd.0000733.
- Burleigh, Barbara a. 2005. "Host Cell Signaling and *Trypanosoma cruzi* Invasion: Do All Roads Lead to Lysosomes?" *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment* 2005 (293): pe36. doi:10.1126/stke.2932005pe36.
- Buscaglia, Carlos a, Vanina a Campo, Alberto C C Frasch, and Javier M Di Noia. 2006. "*Trypanosoma cruzi* Surface Mucins: Host-Dependent Coat Diversity." *Nature Reviews. Microbiology* 4 (3): 229–36. doi:10.1038/nrmicro1351.
- Cai, Catherine W., Jennifer R. Blase, Xiuli Zhang, Christopher S. Eickhoff, and Daniel F. Hoft. 2016. "Th17 Cells Are More Protective Than Th1 Cells Against the Intracellular Parasite *Trypanosoma cruzi*." *PLoS Pathogens* 12 (10): 1–23. doi:10.1371/journal.ppat.1005902.
- Cardillo, Fabiola, Edilberto Postol, Jorge Nihei, Luiz S. Aroeira, Auro Nomizo, and José Mengel. 2007. "B Cells Modulate T Cells so as to Favour T Helper Type 1 and CD8 + T-Cell Responses in the Acute Phase of *Trypanosoma cruzi* Infection." *Immunology* 122 (4): 584–95. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02677.x.
- Cardillo, F, J C Voltarelli, S G Reed, and J S Silva. 1996. "Regulation of *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice by Gamma Interferon and Interleukin 10: Role of NK Cells." *Infection and Immunity* 64 (1): 128–34. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=173737&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Cardoso, Mariana S., João Luís Reis-Cunha, and Daniella C. Bartholomeu. 2016. "Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection." *Frontiers in Immunology* 6 (JAN): 1–15. doi:10.3389/fimmu.2015.00659.
- Carmicle, Stephanie, N. Kalaya Steede, and Samuel J. Landry. 2007. "Antigen Three-Dimensional Structure Guides the Processing and Presentation of Helper T-Cell Epitopes." *Molecular Immunology* 44 (6): 1159–68. doi:10.1016/j.molimm.2006.06.014.
- Carmona, Santiago J., Morten Nielsen, Claus Schafer-Nielsen, Juan Mucci, Jaime Altchek, Virginia Balouz, Valeria Tekiel, et al. 2015. "Towards High-Throughput Immunomics for Infectious Diseases: Use of Next-Generation Peptide Microarrays for Rapid Discovery and Mapping of Antigenic Determinants." *Molecular & Cellular Proteomics* 14 (7): 1871–84. doi:10.1074/mcp.M114.045906.
- Chen, Lin, Tadashi Watanabe, Hisami Watanabe, and Fujiro Sendo. 2001. "Neutrophil Depletion Exacerbates Experimental Chagas' Disease in BALB / C, but Protects C57BL / 6 Mice through Modulating the Th1 / Th2 Dichotomy in Different Directions." *European Journal of Immunology* 31 (1): 265–75. doi:10.1002/1521-4141(200101)31:1<265::AID-IMMU265>3.0.CO;2-L.
- Cherukuri, A., P. C. Cheng, and S. K. Pierce. 2001. "The Role of the CD19/CD21 Complex in B Cell Processing and Presentation of Complement-Tagged Antigens." *The Journal of Immunology* 167 (1): 163–72. doi:10.4049/jimmunol.167.1.163.
- Cobb, D., and R. B. Smeltz. 2012. "Regulation of Proinflammatory Th17 Responses during *Trypanosoma cruzi* Infection by IL-12 Family Cytokines." *The Journal of Immunology* 188 (8): 3766–73. doi:10.4049/jimmunol.1103478.
- Costa, R P, K J Gollob, L L Fonseca, M O C Rocha, A C L Chaves, N Medrano-mercado, T C Arau Â Jo-jorge, et al. 2000. "T-Cell Repertoire Analysis in Acute and Chronic Human Chagas' Disease: Differential Frequencies of Vb5 Expressing T Cells." *Scand J Immunol* 51: 511–19.
- Coura, José Rodrigues, and José Borges-Pereira. 2010. "Chagas Disease: 100 Years after Its Discovery. A Systemic Review." *Acta Tropica* 115 (1–2): 5–13. doi:10.1016/j.actatropica.2010.03.008.
- Cuéllar, Adriana, Francia Rojas, Natalia I. Bolaños, Hugo Diez Ortega, María del Carmen Thomas, Fernando Rosas, Víctor Manuel Velasco, Manuel Carlos López, John

- Mario González, and Concepción Judith Puerta Bula. 2009. "Natural CD4(+) T-Cell Responses against *Trypanosoma cruzi* KMP-11 Protein in Chronic Chagasic Patients." *Immunology and Cell Biology*. 87 (2): 149–53. doi:10.1038/icb.2008.76.
- Cunha-Neto, Edécio, Veronica Coelho, Luiza Guilherme, Alfredo Fiorelli, Noedir Stolf, and Jorge Kalil. 1996. "Autoimmunity in Chagas' Disease: Identification of Cardiac Myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* Protein Crossreactive T Cell Clones in the Heart Lesions of a Chronic Chagas' Cardiomyopathy Patients." *Journal of Clinical Investigation* 98 (8): 1709–12.
- Da Costa, Thiago Alvares, Marcos Vinicius Silva, Maria Tays Mendes, Tamires Marielem Carvalho-Costa, Lara Rocha Batista, Eliane Lages-Silva, Virmondes Rodrigues, Carlo Jose Oliveira, and Luis Eduardo Ramirez. 2014. "Immunomodulation by *Trypanosoma cruzi*: Toward Understanding the Association of Dendritic Cells with Infecting TcI and TcII Populations." *Journal of Immunology Research* 2014. doi:10.1155/2014/962047.
- da Silveira, Alexandre B M, Fernanda Fortes de Araújo, Michelle A Ribeiro Freitas, Juliana Assis Silva Gomes, Ana Thereza Chaves, Enio C. de Oliveira, Salustiano G. Neto, et al. 2009. "Characterization of the Presence and Distribution of Foxp3+ Cells in Chagasic Patients with and without Megacolon." *Human Immunology* 70 (1): 65–67. doi:10.1016/j.humimm.2008.10.015.
- da Silveira, Alexandre Barcelos Morais, Elenice M. Lemos, Sheila J. Adad, Rodrigo Correa-Oliveira, John B. Furness, and Débora D'Avila Reis. 2007. "Megacolon in Chagas Disease: A Study of Inflammatory Cells, Enteric Nerves, and Glial Cells." *Human Pathology* 38 (8): 1256–64. doi:10.1016/j.humpath.2007.01.020.
- de Araújo, Fernanda Fortes, Danielle Marquete Vitelli-Avelar, Andréa Teixeira-Carvalho, Paulo Renato Zuquim Antas, Juliana Assis Silva Gomes, Renato Sathler-Avelar, Manoel Otávio Costa Rocha, et al. 2011. "Regulatory T Cells Phenotype in Different Clinical Forms of Chagas' Disease." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (5): 1–8. doi:10.1371/journal.pntd.0000992.
- de Oliveira Mendes, Tiago Antônio, Joao Luís Reis Cunha, Rodrigo de Almeida Lourdes, Gabriela Flávia Rodrigues Luiz, Lucas Dhom Lemos, Ana Rita Rocha dos Santos, Antônia Cláudia Jácome da Câmara, et al. 2013. "Identification of Strain-Specific B-Cell Epitopes in *Trypanosoma cruzi* Using Genome-Scale Epitope Prediction and High-Throughput Immunoscreening with Peptide

- Arrays.” PLoS Neglected Tropical Diseases 7 (10). doi:10.1371/journal.pntd.0002524.
- De Souza, Wanderley, Tecia Maria Ulisses De Carvalho, and Emile Santos Barrias. 2010. “Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction.” International Journal of Cell Biology 2010. doi:10.1155/2010/295394.
- Díaz, Pablo Ruiz, Juan Mucci, María Ana Meira, Yanina Bogliotti, Daniel Musikant, María Susana Leguizamón, Oscar Campetella, et al. 2015. “*Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase Prevents Th1 Elicitation via Interleukin 10 and Downregulates Th1 Effector Cells.” Infection and Immunity 83 (March): IAI.00031-15. doi:10.1128/IAI.00031-15.
- Dos-Santos, A. L.A., L. F. Carvalho-Kelly, C. F. Dick, and J. R. Meyer-Fernandes. 2016. “Innate Immunomodulation to Trypanosomatid Parasite Infections.” Experimental Parasitology 167. Elsevier Ltd: 67–75. doi:10.1016/j.exppara.2016.05.005.
- dos Santos Virgilio, Fernando, Camila Pontes, Mariana Ribeiro Dominguez, Jonatan Ersching, Mauricio Martins Rodrigues, and José Ronnie Vasconcelos. 2014. “CD8 + T Cell-Mediated Immunity during *Trypanosoma cruzi* Infection: A Path for Vaccine Development?” Mediators of Inflammation 2014. Hindawi Publishing Corporation: 1–12. doi:10.1155/2014/243786.
- Dotiwala, Farokh, Sachin Mulik, Rafael B Polidoro, James A Ansara, Barbara A Burleigh, Michael Walch, Ricardo T Gazzinelli, and Judy Lieberman. 2016. “Killer Lymphocytes Use Granulysin, Perforin and Granzymes to Kill Intracellular Parasites.” Nature Medicine 22 (2): 210–18. doi:10.1038/nm.4023.
- Dutra, W. O., C. a. S. Menezes, L. M. D. Magalhães, and K. J. Gollob. 2014. “Immunoregulatory Networks in Human Chagas Disease.” Parasite Immunology 36 (8): 377–87. doi:10.1111/pim.12107.
- Dutra, Walderez O., and Kenneth J. Gollob. 2008. “Current Concepts in Immunoregulation and Pathology of Human Chagas Disease.” Current Opinion in Infectious Diseases 21 (3): 287–92. doi:10.1086/498510.Parasitic.
- Egui, Adriana, M.C. Carmen Thomas, María Morell, Concepción Marañón, Bartolomé Carrilero, Manuel Segovia, Concepción J. C.J. Puerta, et al. 2012. “*Trypanosoma cruzi* Paraflagellar Rod Proteins 2 and 3 Contain

- Immunodominant CD8+ T-Cell Epitopes That Are Recognized by Cytotoxic T Cells from Chagas Disease Patients.” *Molecular Immunology* 52 (3–4): 289–98. doi:10.1016/j.molimm.2012.05.021.
- Engman, David M., and Juan S. Leon. 2002. “Pathogenesis of Chagas Heart Disease: Role of Autoimmunity.” *Acta Tropica* 81 (2): 123–32. doi:10.1016/S0001-706X(01)00202-9.
- Erdmann, Hanna, Christiane Steeg, Friedrich Koch-Nolte, Bernhard Fleischer, and Thomas Jacobs. 2009. “Sialylated Ligands on Pathogenic *Trypanosoma cruzi* Interact with Siglec-E (Sialic Acid-Binding Ig-like Lectin-E).” *Cellular Microbiology* 11 (11): 1600–1611. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01350.x.
- Fares, R. C.G., R. Correa-Oliveira, F. F. de Araújo, T. S.L. Keesen, A. T. Chaves, J. A. Fiuza, K. S. Ferreira, M. O.C. Rocha, and J. A.S. Gomes. 2013. “Identification of Phenotypic Markers of B Cells from Patients with Chagas Disease.” *Parasite Immunology* 35 (7–8): 214–23. doi:10.1111/pim.12038.
- Fernández-Mestre, M T, D Jaraquemada, R E Bruno, J Caro, and Z Layrisse. 2002. “Analysis of the T-Cell Receptor Beta-Chain Variable-Region (Vbeta) Repertoire in Chronic Human Chagas’ Disease.” *Tissue Antigens* 60 (3): 10–15. doi:10.1034/j.1399-0039.2002.600102.x.
- Fernández, Esteban R., Gabriela C. Olivera, Luz P. Quebrada Palacio, Mariela N. González, Yolanda Hernandez-Vasquez, Natalia María Sirena, María L. Morán, Oscar S. Ledesma Patiño, and Miriam Postan. 2014. “Altered Distribution of Peripheral Blood Memory B Cells in Humans Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*.” *PLoS ONE* 9 (8). doi:10.1371/journal.pone.0104951.
- Ferreira, Ludmila Rodrigues Pinto, Frederico Moraes Ferreira, Helder Imoto Nakaya, Xutao Deng, Darlan da Silva Cândido, Lea Campos de Oliveira, Jean-Noel Billaud, et al. 2015. “Blood Gene Signatures of Chagas Disease Cardiomyopathy with or without Ventricular Dysfunction.” *Journal of Infectious Diseases* 3 (215): 387–95. doi:https://doi.org/10.1093/infdis/jiw540.
- Ferreira, Viviana, Carolina Valck, Gittith Sánchez, Alexandre Gingras, Sotiria Tzima, María Carmen Molina, Robert Sim, Wilhelm Schwaeble, and Arturo Ferreira. 2004. “The Classical Activation Pathway of the Human Complement System Is Specifically Inhibited by Calreticulin from *Trypanosoma cruzi*.” *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 172 (5): 3042–50. doi:10.4049/jimmunol.172.5.3042.

- Fiuza, Jacqueline Araújo, Ricardo Toshio Fujiwara, Juliana Assis Silva Gomes, Manoel Otávio Das Costa Rocha, Ana Thereza Chaves, Fernanda Fortes De Araújo, Rafaelle Christine Gomes Fares, et al. 2009. “Profile of Central and Effector Memory T Cells in the Progression of Chronic Human Chagas Disease.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3 (9). doi:10.1371/journal.pntd.0000512.
- Fonseca, S. G., M. M. Reis, V. Coelho, L. G. Nogueira, S. M. Monteiro, E. C. Mairena, F. Bacal, et al. 2007. “Locally Produced Survival Cytokines IL-15 and IL-7 May Be Associated to the Predominance of CD8+ T Cells at Heart Lesions of Human Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy.” *Scandinavian Journal of Immunology* 66 (2–3): 362–71. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.01987.x.
- Fonseca, Simone G., Héléne Héléne Héléne Héléne Héléne Moins-Teisserenc, Emmanuel Clave, Bárbara B??rbara Bárbara B??rbara B??rbara B??rbara Bárbara B??rbara B??rbara B??rbara Ianni, Vera Lopes Nunes, Charles Mady, Leo K. Iwai, et al. 2005. “Identification of Multiple HLA-A*0201-Restricted Cruzipain and FL-160 CD8+ Epitopes Recognized by T Cells from Chronically *Trypanosoma cruzi*-Infected Patients.” *Microbes and Infection* 7 (4): 688–97. doi:10.1016/j.micinf.2005.01.001.
- Fralish, Bolyn H., and Rick L. Tarleton. 2003. “Genetic Immunization with LYT1 or a Pool of Trans-Sialidase Genes Protects Mice from Lethal *Trypanosoma cruzi* Infection.” *Vaccine* 21 (21–22): 3070–80. doi:10.1016/S0264-410X(03)00121-X.
- Gao, Wenda, Henry H Wortis, and Miercio a Pereira. 2002. “The *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase Is a T Cell-Independent B Cell Mitogen and an Inducer of Non-Specific Ig Secretion.” *International Immunology* 14 (3): 299–308. doi:10.1093/intimm/14.3.299.
- Garg, Nisha, Marise P. Nunes, and Rick L. Tarleton. 1997. “Delivery by *Trypanosoma cruzi* of Proteins into the MHC Class I Antigen Processing and Presentation Pathway.” *Journal of Immunology* 158: 3293–3302.
- Gattinoni, Luca, Enrico Lugli, Yun Ji, Zoltan Pos, Chrystal M Paulos, Máire F Quigley, Jorge R Almeida, et al. 2011. “A Human Memory T Cell Subset with Stem Cell – like Properties.” *Nature Medicine* 17 (10): 1290–98. doi:10.1038/nm.2446.
- Geginat, J, F Sallusto, and a Lanzavecchia. 2001. “Cytokine-Driven Proliferation and Differentiation of Human Naive, Central Memory, and Effector Memory

- CD4(+) T Cells.” *The Journal of Experimental Medicine* 194 (12): 1711–19. doi:10.1084/jem.194.12.1711.
- Geiger, Anne, Géraldine Bossard, Denis Sereno, Joana Pissarra, Jean Loup Lemesre, Philippe Vincendeau, and Philippe Holzmüller. 2016. “Escaping Deleterious Immune Response in Their Hosts: Lessons from Trypanosomatids.” *Frontiers in Immunology* 7 (MAY): 1–21. doi:10.3389/fimmu.2016.00212.
- Geiger, Rebekka, Thomas Duhén, Antonio Lanzavecchia, and Federica Sallusto. 2009. “Human Naive and Memory CD4+ T Cell Repertoires Specific for Naturally Processed Antigens Analyzed Using Libraries of Amplified T Cells.” *The Journal of Experimental Medicine* 206 (7): 1525–34. doi:10.1084/jem.20090504.
- Gil-Jaramillo, Natalia, Flávia N. Motta, Cecília B. F. Favali, Izabela M. D. Bastos, and Jaime M. Santana. 2016. “Dendritic Cells: A Double-Edged Sword in Immune Responses during Chagas Disease.” *Frontiers in Microbiology* 7 (July): 1–12. doi:10.3389/fmicb.2016.01076.
- Gironès, N., H. Cuervo, and M. Fresno. 2005. “*Trypanosoma cruzi*-Induced Molecular Mimicry and Chagas’ Disease.” In *Molecular Mimicry: Infection-Inducing Autoimmune Disease*, 89–123.
- Godkin, A. J., K. J. Smith, A. Willis, M. V. Tejada-Simon, J. Zhang, T. Elliott, and A. V. S. Hill. 2001. “Naturally Processed HLA Class II Peptides Reveal Highly Conserved Immunogenic Flanking Region Sequence Preferences That Reflect Antigen Processing Rather Than Peptide-MHC Interactions.” *The Journal of Immunology* 166 (11): 6720–27. doi:10.4049/jimmunol.166.11.6720.
- Gomes, J A S, M O C Rocha, and G Gazzinelli. 2003. “Evidence That Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas’ Disease Is Due to a Th1-Specific Immune Response Evidence That Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas’ Disease Is Due to a Th1-Specific Immune Response” 71 (3): 1185–93. doi:10.1128/IAI.71.3.1185.
- Gomes, Juliana a S, Lilian M G Bahia-oliveira, Otávio C Rocha, Solange C U Busek, Mauro M Teixeira, João Santana Silva, Rodrigo Correa-oliveira, Manoel Ota, and C Rocha. 2005. “Type 1 Chemokine Receptor Expression in Chagas’ Disease Correlates with Morbidity in Cardiac Patients Type 1 Chemokine Receptor Expression in Chagas’ Disease Correlates with Morbidity in Cardiac Patients” 73 (12): 7960–66. doi:10.1128/IAI.73.12.7960.

- Gómez, KA, SA Longhi, and MJ Levin. 2006. "The Genesis of Anti-Cardiac G Protein Coupled Receptor Antibodies in Chagas Disease." In *Immunology of G-Protein Coupled Receptors*, edited by Jean-Christophe Peter, 45–63. Ketala, India: Dipak Haldar, S.G.
- Grauert, M R, M Houdayer, and M Hontebeyrie-Joskowicz. 1993. "Trypanosoma cruzi Infection Enhances Polyreactive Antibody Response in an Acute Case of Human Chagas' Disease." *Clin Exp Immunol* 93 (1): 85–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7686828>.
- Guilmot, A., Y. Carlier, and C. Truyens. 2014. "Differential IFN- γ Production by Adult and Neonatal Blood CD56+ Natural Killer (NK) and NK-like-T Cells in Response to *Trypanosoma cruzi* and IL-15." *Parasite Immunology* 36 (1): 43–52. doi:10.1111/pim.12077.
- Henrique, Priscila Moraes, Tatiane Marques, Marcos Vinícius da Silva, Gabriel Antônio Nogueira Nascentes, Carlo Freire de Oliveira, Virmondes Rodrigues, César Gómez-Hernández, Karen Ann Norris, Luis Eduardo Ramirez, and Wendell Sérgio Ferreira Meira. 2016. "Correlation between the Virulence of *T. cruzi* Strains, Complement Regulatory Protein Expression Levels, and the Ability to Elicit Lytic Antibody Production." *Experimental Parasitology* 170: 66–72. doi:10.1016/j.exppara.2016.09.001.
- Hoft, Daniel F., and Chris S. Eickhoff. 2005. "Type 1 Immunity Provides Both Optimal Mucosal and Systemic Protection against a Mucosally Invasive, Intracellular Pathogen." *Infection and Immunity* 73 (8): 4934–40. doi:10.1128/IAI.73.8.4934-4940.2005.
- Hoof, Ilka, Bjoern Peters, John Sidney, Lasse Eggers Pedersen, Alessandro Sette, Ole Lund, Søren Buus, and Morten Nielsen. 2009. "NetMHCpan, a Method for MHC Class I Binding Prediction beyond Humans." *Immunogenetics* 61 (1): 1–13. doi:10.1007/s00251-008-0341-z.
- Iwai, Leo Kei, Maria a. Juliano, Luiz Juliano, Jorge Kalil, and Edecio Cunha-Neto. 2005. "T-Cell Molecular Mimicry in Chagas Disease: Identification and Partial Structural Analysis of Multiple Cross-Reactive Epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and Cardiac Myosin Heavy Chain." *Journal of Autoimmunity* 24: 111–17. doi:10.1016/j.jaut.2005.01.006.

- Josefowicz, Steven Z., Li-Fan Lu, and Alexander Y. Rudensky. 2012. "Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function." *Annual Review of Immunology* 30: 531–64. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623.
- Judkowski, Valeria A, Radleigh G Santos, Gonzalo Acevedo, Marc A Giulianotti, Jon R Appel, Silvia Longhi, Karina A Gomez, and Clemencia Pinilla. 2015. "Antigen Discovery for the Identification of Vaccine Candidates and Biomarkers Using a T Cell Driven Approach in Combination with Positional Scanning Peptide Libraries." *Procedia in Vaccinology* 9. Elsevier B.V.: 91–95. doi:10.1016/j.provac.2015.05.013.
- Junqueira, Caroline, Braulia Caetano, Daniella C. Bartholomeu, Mariane B. Melo, Catherine Ropert, Maurício M. Rodrigues, and Ricardo T. Gazzinelli. 2010. "The Endless Race between *Trypanosoma cruzi* and Host Immunity: Lessons for and beyond Chagas Disease." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 12 (September): e29. doi:10.1017/S1462399410001560.
- Kahn, S J, and M Wleklinski. 1997. "The Surface Glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* Encode a Superfamily of Variant T Cell Epitopes." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md: 1950) 159 (9): 4444–51. <http://www.jimmunol.org/cgi/reprint/159/9/4444%5Cnpapers2://publication/uuid/6F257B5E-6ADA-4265-9005-D65CFC693E4B>.
- Karosiene, Edita, Michael Rasmussen, Thomas Blicher, Ole Lund, Søren Buus, and Morten Nielsen. 2013. "NetMHCIIpan-3.0, a Common Pan-Specific MHC Class II Prediction Method Including All Three Human MHC Class II Isotypes, HLA-DR, HLA-DP and HLA-DQ." *Immunogenetics* 65: 711–24. doi:10.1007/s00251-013-0720-y.
- Kim, Mihyung, Hee Bom Moon, Kilhyoun Kim, and Ki Young Lee. 2006. "Antigen Dose Governs the Shaping of CTL Repertoires *in vitro* and *in vivo*." *International Immunology* 18 (3): 435–44. doi:10.1093/intimm/dxh383.
- Koch, Sven, Anis Larbi, Evelyn Derhovanessian, Dennis Özcelik, Elissaveta Naumova, and Graham Pawelec. 2008. "Multiparameter Flow Cytometric Analysis of CD4 and CD8 T Cell Subsets in Young and Old People." *Immunity & Ageing* 5 (1): 6. doi:10.1186/1742-4933-5-6.
- Kotner, Joshua, and Rick Tarleton. 2007. "Endogenous CD4+ CD25+ Regulatory T Cells Have a Limited Role in the Control of *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice." *Infection and Immunity* 75 (2): 861–69. doi:10.1128/IAI.01500-06.

- Krautz, Greice M., Jessica C. Kissinger, and Antoniana U. Krettli. 2000. "The Targets of the Lytic Antibody Response against *Trypanosoma cruzi*." *Parasitology Today* 16 (1): 31–34. doi:10.1016/S0169-4758(99)01581-1.
- Kumar, S, and R L Tarleton. 1998. "The Relative Contribution of Antibody Production and CD8+ T Cell Function to Immune Control of *Trypanosoma cruzi*." *Parasite Immunol* 20 (5): 207–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9651921>.
- . 2001. "Antigen-Specific Th1 but Not Th2 Cells Provide Protection from Lethal *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166 (7): 4596–4603. doi:10.4049/jimmunol.166.7.4596.
- Labovsky, V, CR Smulski, K Gómez, G Levy, and MJ Levin. 2007. "Anti- β -Adrenergic Receptor Autoantibodies in Patients with Chronic Chagas Heart Disease." *Clinical and Experimental Immunology* 140: 440–49. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03381.x.
- Laidlaw, Brian J., Joseph E. Craft, and Susan M. Kaech. 2016. "The Multifaceted Role of CD4+ T Cells in CD8+ T Cell Memory." *Nature Reviews. Immunology* 16 (2). Nature Publishing Group: 102–11. doi:10.1038/nri.2015.10.
- Lan, Ke, Subhash C Verma, Masanao Murakami, Bharat Bajaj, and Erle S Robertson. 2007. "Epstein-Barr Virus (EBV): Infection, Propagation, Quantitation, and Storage." *Current Protocols in Microbiology* Chapter 14 (August): Unit 14E.2. doi:10.1002/9780471729259.mc14e02s6.
- Lannes-Vieira, Joseli. 2003. "*Trypanosoma cruzi*-Elicited CD8+ T Cell-Mediated Myocarditis: Chemokine Receptors and Adhesion Molecules as Potential Therapeutic Targets to Control Chronic Inflammation?" *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (3): 299–304. doi:10.1590/S0074-02762003000300002.
- Lanzavecchia, Antonio, and Federica Sallusto. 2005. "Understanding the Generation and Function of Memory T Cell Subsets." *Current Opinion in Immunology* 17 (3): 326–32. doi:10.1016/j.coi.2005.04.010.
- Laucella, Susana a, Miriam Postan, Diana Martin, Bolyn Hubby Fralish, Maria C Albareda, Maria G Alvarez, Bruno Lococo, Gustavo Barbieri, Rodolfo J Viotti, and Rick L Tarleton. 2004. "Frequency of Interferon- γ -Producing T Cells Specific for *Trypanosoma cruzi* Inversely Correlates with Disease Severity in Chronic Human Chagas Disease." *The Journal of Infectious Diseases* 189 (5): 909–18. doi:10.1086/381682.

- Leavey, Jennifer K, and Rick L Tarleton. 2003. "Cutting Edge: Dysfunctional CD8+ T Cells Reside in Nonlymphoid Tissues during Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 170 (5): 2264–68. doi:10.4049/jimmunol.170.5.2264.
- Leung, Carol S., Michael a. Maurer, Sonja Meixlsperger, Anne Lippmann, Cheolho Cheong, Jianmin Zuo, Tracey a. Haigh, Graham S. Taylor, and Christian Münz. 2013. "Robust T-Cell Stimulation by Epstein-Barr Virus-Transformed B Cells after Antigen Targeting to DEC-205." *Blood* 121: 1584–94. doi:10.1182/blood-2012-08-450775.
- Lewinsohn, D. M., A. L. Briden, S. G. Reed, K. H. Grabstein, and M. R. Alderson. 2000. "Mycobacterium Tuberculosis-Reactive CD8+ T Lymphocytes: The Relative Contribution of Classical Versus Nonclassical HLA Restriction." *The Journal of Immunology* 165 (2): 925–30. doi:10.4049/jimmunol.165.2.925.
- Lewinsohn, Deborah A., Ervina Winata, Gwendolyn M. Swarbrick, Katie E. Tanner, Matthew S. Cook, Megan D. Null, Meghan E. Cansler, Alessandro Sette, John Sidney, and David M. Lewinsohn. 2007. "Immunodominant Tuberculosis CD8 Antigens Preferentially Restricted by HLA-B." *PLoS Pathogens* 3 (9): 1240–49. doi:10.1371/journal.ppat.0030127.
- Lidani, Kárita C.F., Lorena Bavia, Altair R. Ambrosio, and Iara J. de Messias-Reason. 2017. "The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*." *Frontiers in Microbiology* 8 (APR): 1–14. doi:10.3389/fmicb.2017.00607.
- Lieke, T., C. Steeg, S. E.B. Graefe, B. Fleischer, and T. Jacobs. 2006. "Interaction of Natural Killer Cells with *Trypanosoma cruzi*-Infected Fibroblasts." *Clinical and Experimental Immunology* 145 (2): 357–64. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03118.x.
- Lieke, Thorsten, Sebastian E B Graefe, Ulricke Klauenberg, Bernhard Fleischer, and Thomas Jacobs. 2004. "NK Cells Contribute to the Control of *Trypanosoma cruzi* Infection by Killing Free Parasites by Perforin-Independent Mechanisms NK Cells Contribute to the Control of *Trypanosoma cruzi* Infection by Killing Free Parasites by Perforin-Independent Mechanisms." *Infection and Immunity* 72 (12): 6817–25. doi:10.1128/IAI.72.12.6817.
- Longhi, Silvia A., Augusto Atienza, Graciela Perez Prados, AlcINETTE Buying, Virginia Balouz, Carlos a. Buscaglia, Radleigh Santos, et al. 2014. "Cytokine Production but Lack of Proliferation in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Chronic

- Chagas' Disease Cardiomyopathy Patients in Response to *T. cruzi* Ribosomal P Proteins." PLoS Neglected Tropical Diseases 8 (6). doi:10.1371/journal.pntd.0002906.
- Low, H P, M A Santos, B Wizel, and R L Tarleton. 1998. "Amastigote Surface Proteins of *Trypanosoma cruzi* Are Targets for CD8+ CTL." Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950) 160 (4): 1817–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9469442>.
- Luna-Gomes, Tatiana, Alessandra A. Filardy, Juliana Dutra B Rocha, Debora Decote-Ricardo, Isabel Ferreira LaRocque-de-Freitas, Alexandre Morrot, Patrícia T. Bozza, et al. 2014. "Neutrophils Increase or Reduce Parasite Burden in *Trypanosoma cruzi*-Infected Macrophages, Depending on Host Strain: Role of Neutrophil Elastase." PLoS ONE 9 (3): 3–10. doi:10.1371/journal.pone.0090582.
- Lundegaard, C, and Carina Perez. 2010. "PopCover – A Method for Selecting of Peptides with Optimal Population and Pathogen Coverage." BCB '10 Proceedings of the First ACM International Conference on Bioinformatics and Computational Biology, 658–59. doi:10.1145/1854776.1854905.
- Mahnke, Yolanda D., Tess M. Brodie, Federica Sallusto, Mario Roederer, and Enrico Lugli. 2013. "The Who's Who of T-Cell Differentiation: Human Memory T-Cell Subsets." European Journal of Immunology 43 (11): 2797–2809. doi:10.1002/eji.201343751.
- Martin, Diana L., Miriam Postan, Philip Lucas, Ronald Gress, and Rick L. Tarleton. 2007. "TGF- β Regulates Pathology but Not Tissue CD8+ T Cell Dysfunction during Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection." European Journal of Immunology 37 (10): 2764–71. doi:10.1002/eji.200737033.
- Martin, Diana L., D. Brent Weatherly, Susana A. Laucella, Melissa a. Cabinian, Matthew T. Crim, Susan Sullivan, Mark Heiges, et al. 2006. "CD8+ T-Cell Responses to *Trypanosoma cruzi* Are Highly Focused on Strain-Variant Trans-Sialidase Epitopes." PLoS Pathogens 2 (8): 0731–40. doi:10.1371/journal.ppat.0020077.
- Martin, Diana, and Rick Tarleton. 2004. "Generation, Specificity, and Function of CD8+ T Cells in *Trypanosoma cruzi* Infection." Immunological Reviews 201: 304–17. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00183.x.

- Mateus, Jose, Paola Lasso, Paula Pavia, Fernando Rosas, Nubia Roa, Carlos Andrés Valencia-Hernández, John Mario González, et al. 2015. "Low Frequency of Circulating CD8+ T Stem Cell Memory Cells in Chronic Chagasic Patients with Severe Forms of the Disease." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (1): e3432. doi:10.1371/journal.pntd.0003432.
- Medeiros, NI Nayara I., Rafaelle C. G. RC Fares, Eliza P. Franco, GR Giovane R. GR Giovane R. Sousa, Rafael T. Mattos, Ana T. AT AC AT Chaves, Maria do Carmo P. MP Nunes, et al. 2017. "Differential Expression of Matrix Metalloproteinases 2, 9 and Cytokines by Neutrophils and Monocytes in the Clinical Forms of Chagas Disease." *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11 (1): e0005284. doi:10.1371/journal.pntd.0005284.
- Menezes, C. A S, M. O C Rocha, P. E A Souza, A. C L Chaves, K. J. Gollob, and W. O. Dutra. 2004. "Phenotypic and Functional Characteristics of CD28+ and CD28- Cells from Chagasic Patients: Distinct Repertoire and Cytokine Expression." *Clinical and Experimental Immunology* 137 (1): 129–38. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02479.x.
- Ministerio de Salud de la Nación. 2017. "¿Qué Es El Chagas?" Accessed December 6. <http://www.msal.gob.ar/chagas/index.php/informacion-para-ciudadanos/iques-el-chagas>.
- Minoprio, P., O. Burlen, P. Pereira, B. Guilbert, L. Andrade, M. Hontebeyrie-Joskowicz, and A. Coutinho. 1988. "Most B Cells in Acute *Trypanosoma cruzi* Infection Lack Parasite Specificity." *Scandinavian Journal of Immunology* 28 (5): 553–61. doi:10.1111/j.1365-3083.1988.tb01487.x.
- Montes, Carolina L., Eva V. Acosta-Rodríguez, Juan Mucci, Elina I. Zuniga, Oscar Campetella, and Adriana Gruppi. 2006. "A *Trypanosoma cruzi* Antigen Signals CD11b+ Cells to Secrete Cytokines That Promote Polyclonal B Cell Proliferation and Differentiation into Antibody-Secreting Cells." *European Journal of Immunology* 36 (6): 1474–85. doi:10.1002/eji.200535537.
- Nielsen, Morten, and Massimo Andreatta. 2016. "NetMHCpan-3.0; Improved Prediction of Binding to MHC Class I Molecules Integrating Information from Multiple Receptor and Peptide Length Datasets." *Genome Medicine* 8 (1). *Genome Medicine*: 33. doi:10.1186/s13073-016-0288-x.
- Norris, K A, B Bradt, N R Cooper, and M So. 1991. "Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 Binding Protein with Functional and Genetic Similarities to the Human

- Complement Regulatory Protein, Decay-Accelerating Factor.” *J Immunol* 147 (7): 2240–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1717552>.
- Norris, K a, J E Schrimpf, and M J Szabo. 1997. “Identification of the Gene Family Encoding the 160-Kilodalton *Trypanosoma cruzi* Complement Regulatory Protein.” *Infection and Immunity* 65 (2): 349–57. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=174602&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nunes, Marise Pinheiro, Bárbara Fortes, João Luiz Silva-Filho, Eugênia Terra-Granado, Leonardo Santos, Luciana Conde, Isadora de Araújo Oliveira, et al. 2013. “Inhibitory Effects of *Trypanosoma cruzi* Sialoglycoproteins on CD4+ T Cells Are Associated with Increased Susceptibility to Infection.” *PLoS ONE* 8 (10). doi:10.1371/journal.pone.0077568.
- Oldstone, M. B. A. 2005. *Molecular Mimicry: Infection-Inducing Autoimmune Disease*. Vol. 296. doi:10.1007/3-540-30791-5.
- OMS. 2010. “First OMS Report on Neglected Tropical Diseases: Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases.” World Health Organization, 1–184. doi:10.1177/1757913912449575.
- OMS. 2017a. “La Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana).” Nota Descriptiva. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>.
- OMS. 2017b. “Integrating Neglected Tropical Diseases into Global Health and Development: 4th OMS Report on Neglected Tropical Diseases.”
- Ortiz-ortiz, Librado, D Elliot Parks, Miguel Rodriguez, and William Weigle. 1980. “Polyclonal B Lymphocyte Activation during *Trypanosoma cruzi* Infection.” *Journal of Immunology* 124 (1): 121–26.
- Oyarzun, P., and B. Kobe. 2015. “Computer-Aided Design of T-Cell Epitope-Based Vaccines: Addressing Population Coverage.” *International Journal of Immunogenetics* 42 (5): 313–21. doi:10.1111/iji.12214.
- Padilla, Angel M., Juan M. Bustamante, and Rick L. Tarleton. 2009. “CD8+ T Cells in *Trypanosoma cruzi* Infection.” *Current Opinion in Immunology* 21 (4): 385–90. doi:10.1016/j.coi.2009.07.006.

- Padilla, Angel, Dan Xu, Diana Martin, and Rick Tarleton. 2007. "Limited Role for CD4+ T-Cell Help in the Initial Priming of *Trypanosoma cruzi*-Specific CD8+ T Cells." *Infection and Immunity* 75 (1): 231–35. doi:10.1128/IAI.01245-06.
- Pérez-Molina, José A., and Israel Molina. 2017. "Chagas Disease." *The Lancet* 6736 (17): 1–13. doi:10.1016/S0140-6736(17)31612-4.
- Petray, Patricia B., Martín E. Rottenberg, Gustavo Bertot, Ricardo S. Corral, Alberto Diaz, Anders Örn, and Saúl Grinstein. 1993. "Effect of Anti- γ -Interferon and Anti-Interleukin-4 Administration on the Resistance of Mice against Infection with Reticulotropic and Myotropic Strains of *Trypanosoma cruzi*." *Immunology Letters* 35 (1): 77–80. doi:10.1016/0165-2478(93)90151-Q.
- Pinilla, Clemencia, Jon R Appel, Valeria Judkowski, and Richard A Houghten. 2012. "Identification of B Cell and T Cell Epitopes Using Synthetic Peptide Combinatorial Libraries." In *Current Protocols in Immunology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/0471142735.im0905s99.
- Pitcovsky, Tamara A, Carlos A Buscaglia, Juan Mucci, and Oscar Campetella. 2002. "A Functional Network of Intramolecular Cross-Reacting Epitopes Delays the Elicitation of Neutralizing Antibodies to *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase." *The Journal of Infectious Diseases* 186 (3): 397–404. doi:10.1086/341463.
- Piuevam, M R, D M Russo, JM M Burns, Y A Skeiky, K H Grabstein, and S G Reed. 1993. "Characterization of Responses of Normal Human T Cells to *Trypanosoma cruzi* Antigens." *Journal of Immunology* 150 (3): 916–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8423347>.
- Pulendran, Bali, and Rafi Ahmed. 2006. "Translating Innate Immunity into Immunological Memory: Implications for Vaccine Development." *Cell* 124 (4): 849–63. doi:10.1016/j.cell.2006.02.019.
- Purner, M B, R L Berens, E C Krug, and T J Curiel. 1994. "Epstein-Barr Virus-Transformed B Cells, a Potentially Convenient Source of Autologous Antigen-Presenting Cells for the Propagation of Certain Human Cytotoxic T Lymphocytes." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1 (6): 696–700.
- Ramírez-Tolosa, Galia, and Arturo Ferreira. 2017. "*Trypanosoma cruzi* Evades the Complement System as an Efficient Strategy to Survive in the Mammalian Host: The Specific Roles of Host/Parasite Molecules and *Trypanosoma cruzi*

- Calreticulin.” *Frontiers in Microbiology* 8 (September): 1–13. doi:10.3389/fmicb.2017.01667.
- Rassi, Anis, Anis Rassi, José Antonio Marin-Neto, Anis Rassi Jr, Anis Rassi, José Antonio Marin-Neto, Anis Rassi, et al. 2010. “Chagas Disease.” *The Lancet* 375 (9723). Elsevier Ltd: 1388–1402. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
- Reina-San-Martín, B, W Degraeve, C Rougeot, a Cosson, N Chamond, a Cordeiro-Da-Silva, M Arala-Chaves, a Coutinho, and P Minoprio. 2000. “A B-Cell Mitogen from a Pathogenic Trypanosome Is a Eukaryotic Proline Racemase.” *Nature Medicine* 6 (8): 890–97. doi:10.1038/78651.
- Ribeiro, Carolina H., Nicholas J. Lynch, Cordula M. Stover, Youssif M. Ali, Carolina Valck, Francisca Noya-Leal, Wilhelm J. Schwaeble, and Arturo Ferreira. 2015. “Deficiency in Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease-2 Does Not Increase Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* Infection.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 92 (2): 320–24. doi:10.4269/ajtmh.14-0236.
- Rodrigues, Mauricio M., Marcelo Ribeirão, Vera Pereira-Chioccola, Laurent Renia, and Fabio Costa. 1999. “Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 Cells Revealed by Characterization of the Cellular Immune Response Generated by Immunization with a DNA Vaccine Containing a *Trypanosoma cruzi* Gene.” *Infection and Immunity* 67 (8): 3855–63.
- Rodriguez Coura, José, and Pedro Albajar Viñas. 2010. “Chagas Disease: A New Worldwide Challenge.” *Nature* 115 (June): 14–21. doi:10.1038/nature09221.
- Romano, Patricia Silvia, Juan Agustín Cueto, Ana Florencia Casassa, Mariá Cristina Vanrell, Roberta A. Gottlieb, and Mariá Isabel Colombo. 2012. “Molecular and Cellular Mechanisms Involved in the *Trypanosoma cruzi*/host Cell Interplay.” *IUBMB Life* 64 (5): 387–96. doi:10.1002/iub.1019.
- Rosser, Elizabeth C., and Claudia Mauri. 2015. “Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function.” *Immunity* 42 (4). Elsevier Inc.: 607–12. doi:10.1016/j.immuni.2015.04.005.
- Rubin-de-Celis, Sergio S C, Haruki Uemura, Nobuko Yoshida, and Sergio Schenkman. 2006. “Expression of Trypomastigote Trans-Sialidase in Metacyclic Forms of *Trypanosoma cruzi* Increases Parasite Escape from Its Parasitophorous Vacuole.” *Cellular Microbiology* 8 (12): 1888–98. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00755.x.

- Sallusto, Federica. 2016. "Heterogeneity of Human CD4 + T Cells Against Microbes." *Annual Review of Immunology* 34 (1): 317–34. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112056.
- Sallusto, Federica, Jens Geginat, and Antonio Lanzavecchia. 2004. "Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance." *Annual Review of Immunology*, no. 22: 745–63. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702.
- Sallusto, Federica, and Antonio Lanzavecchia. 2011. "Memory in Disguise." *Nature Publishing Group* 17 (10). Nature Publishing Group: 1182–83. doi:10.1038/nm.2502.
- Sanoja, Cristina, Sofía Carbajosa, Manuel Fresno, and Neri Gironès. 2013. "Analysis of the Dynamics of Infiltrating CD4+ T Cell Subsets in the Heart during Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection." *PLoS ONE* 8 (6). doi:10.1371/journal.pone.0065820.
- Sant, Andrea J, Francisco A Chaves, Frederick R Krafcik, Christopher A Lazarski, Paula Menges, Katherine Richards, and Jason M Weaver. 2007. "Immunodominance in CD4 T-Cell Responses: Implications for Immune Responses to Influenza Virus and for Vaccine Design." *Expert Review of Vaccines* 6 (3): 357–68. doi:10.1586/14760584.6.3.357.
- Santos, Radleigh G., Jon R. Appel, Marc A. Giulianotti, Bruce S. Edwards, Larry A. Sklar, Richard A. Houghten, and Clemencia Pinilla. 2013. "The Mathematics of a Successful Deconvolution: A Quantitative Assessment of Mixture-Based Combinatorial Libraries Screened against Two Formylpeptide Receptors." *Molecules* 18 (6): 6408–24. doi:10.3390/molecules18066408.
- Sartori, A M C, J E Neto, E V Nunes, L M A Braz, H H Caiaffa, O D Oliveira, V A Neto, and M A Shikanai-Yasuda. 2002. "*Trypanosoma cruzi* Parasitemia in Chronic Chagas Disease: Comparison between Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Positive and HIV-Negative Patients." *Journal of Infectious Diseases*, no. August 1999: 872–75. doi:10.1086/342510.
- Sathler-Avelar, R., E. M. Lemos, D. D. Reis, N. Medrano-Mercado, T. C. Araujo-Jorge, P. R Z Antas, R Correa-Oliveira, et al. 2003. "Phenotypic Features of Peripheral Blood Leucocytes during Early Stages of Human Infection with *Trypanosoma cruzi*." *Scandinavian Journal of Immunology* 58 (6): 655–63. doi:10.1111/j.1365-3083.2003.01340.x.

- Scharfstein, Julio, Juliana de Assis Silva Gomes, and Rodrigo Correa-Oliveira. 2009. "Back to the Future in Chagas Disease: From Animal Models to Patient Cohort Studies, Progress in Immunopathogenesis Research." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (SUPPL. 1): 187–98. doi:10.1590/S0074-02762009000900025.
- Schmunis, Gabriel A., and Zaida E. Yadon. 2010. "Chagas Disease: A Latin American Health Problem Becoming a World Health Problem." *Acta Tropica* 115 (1–2). Elsevier B.V.: 14–21. doi:10.1016/j.actatropica.2009.11.003.
- Serna, Carylinda, Joshua A. Lara, Silas P. Rodrigues, Alexandre F. Marques, Igor C. Almeida, and Rosa A. Maldonado. 2014. "A Synthetic Peptide from *Trypanosoma cruzi* Mucin-like Associated Surface Protein as Candidate for a Vaccine against Chagas Disease." *Vaccine* 32 (28). Elsevier Ltd: 3525–32. doi:10.1016/j.vaccine.2014.04.026.
- Silva, JS, PJ Morrissey, KH Grabstein, KM Mohler, D Anderson, and SG Reed. 1992. "Interleukin 10 and Interferon γ Regulation of Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection." *Journal of Experimental Medicine* 175: 169–74.
- Sosoniuk, Eduardo, Gerardo Vallejos, Hany Kenawy, Christine Gaboriaud, Nicole Thielens, Teizo Fujita, Wilhelm Schwaeble, Arturo Ferreira, and Carolina Valck. 2014. "*Trypanosoma cruzi* Calreticulin Inhibits the Complement Lectin Pathway Activation by Direct Interaction with L-Ficolin." *Molecular Immunology* 60 (1). Elsevier Ltd: 80–85. doi:10.1016/j.molimm.2014.03.014.
- Sousa-Rocha, Daniel, Mariana Thomaz-Tobias, Larissa Figueiredo Alves Diniz, Priscila Silva Sampaio Souza, Phileo Pinge-Filho, and Karina Alves Toledo. 2015. "*Trypanosoma cruzi* and Its Soluble Antigens Induce NET Release by Stimulating Toll-like Receptors." *PLoS ONE* 10 (10): 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0139569.
- Souza, Paulo E A, Manoel O C Rocha, Cristiane A S Menezes, Janete S. Coelho, Andréa C L Chaves, Kenneth J. Gollob, and Walderez O. Dutra. 2007. "*Trypanosoma cruzi* Infection Induces Differential Modulation of Costimulatory Molecules and Cytokines by Monocytes and T Cells from Patients with Indeterminate and Cardiac Chagas' Disease." *Infection and Immunity* 75 (4): 1886–94. doi:10.1128/IAI.01931-06.
- Stempin, Cinthia, Laura Giordanengo, Susana Gea, and Fabio Cerbán. 2002. "Alternative Activation and Increase of *Trypanosoma cruzi* Survival in Murine Macrophages

- Stimulated by Cruzipain, a Parasite Antigen.” *Journal of Leukocyte Biology* 72 (4): 727–34.
- Stern, Lawrence J, and J Mauricio Calvo-Calle. 2009. “HLA-DR: Molecular Insights and Vaccine Design.” *Current Pharmaceutical Design* 15 (28): 3249–61. doi:<http://dx.doi.org/10.2174/138161209789105171>.
- Stimpert, Kelly K., and Susan P Montgomery. 2010. “Physycian Awareness of Chagas Disease, USA.” *Emerging Infectious Diseases* 16 (5): 871–72. doi:10.3201/eid1605.091440.
- Sullivan, Nicole L., Christopher S. Eickhoff, John Sagartz, and Daniel F. Hoft. 2015. “Deficiency of Antigen-Specific B Cells Results in Decreased *Trypanosoma cruzi* Systemic but Not Mucosal Immunity due to CD8 T Cell Exhaustion.” *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 194 (4): 1806–18. doi:10.4049/jimmunol.1303163.
- Taibi, A, B Plumas-Marty, A Guevara-Espinoza, R Schöneck, H Pessoa, M Loyens, R Piras, T Aguirre, H Gras-Masse, and M Bossus. 1993. “*Trypanosoma cruzi*: Immunity-Induced in Mice and Rats by Trypomastigote Excretory-Secretory Antigens and Identification of a Peptide Sequence Containing a T Cell Epitope with Protective Activity.” *J Immunol* 151 (5): 2676–89. <http://www.jimmunol.org/cgi/reprint/151/5/2676>.
- Tarleton, R.L., B.H. Koller, A. Latour, and M. Postan. 1992. “Susceptibility of β 2-Microglobulin-Deficient Mice to *Trypanosoma cruzi* Infection.” *Nature* 356: 338–40.
- Tarleton, Rick L. 1990. “Depletion of CD8 + T Cells Increases Susceptibility and Reverses Vaccine-Induced Immunity in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*” *Journal of Immunology* 144: 717–24.
- Tarleton, Rick L. 2015. “CD8+ T Cells in *Trypanosoma cruzi* Infection.” *Seminars in Immunopathology* 37 (3): 233–38. doi:10.1007/s00281-015-0481-9.
- Tumeh, Paul C, Richard C Koya, Thinle Chodon, Nicholas A Graham, Thomas G Graeber, Begoña Comin-Anduix, and Antoni Ribas. 2010. “The Impact of *Ex vivo* Clinical Grade Activation Protocols on Human T-Cell Phenotype and Function for the Generation of Genetically Modified Cells for Adoptive Cell Transfer Therapy.” *Journal of Immunotherapy* (Hagerstown, Md. : 1997) 33 (8): 759–68. doi:10.1097/CJI.0b013e3181f1d644.

- Tyler, K.M. M., and D.M. M. Engman. 2001. "The Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*." *International Journal for Parasitology* 31 (5–6): 472–81. doi:10.1016/S0020-7519(01)00153-9.
- Tzelepis, F., B. C. G. de Alencar, M. L. O. Penido, C. Claser, A. V. Machado, O. Bruna-Romero, R. T. Gazzinelli, and M. M. Rodrigues. 2008. "Infection with *Trypanosoma cruzi* Restricts the Repertoire of Parasite-Specific CD8+ T Cells Leading to Immunodominance." *The Journal of Immunology* 180 (3): 1737–48. doi:10.4049/jimmunol.180.3.1737.
- Tzelepis, F., B. de Alencar, M. Penido, R. Gazzinelli, P. Persechini, and Maurício M. Rodrigues. 2006. "Distinct Kinetics of Effector CD8+ Cytotoxic T Cells after Infection with *Trypanosoma cruzi* in Naive or Vaccinated Mice." *Infection and Immunity* 74 (4): 2477–81. doi:10.1128/IAI.74.4.2477.
- Vaidian, Anil K, Louis M Weiss, and Herbert B Tanowitz. 2004. "Chagas' Disease and AIDS." *Kinetoplastid Biology and Disease* 3 (1): 2. doi:10.1186/1475-9292-3-2.
- Van Overtvelt, Laurence, Muriel Andrieu, Valérie Verhasselt, Francine Connan, Jeannine Choppin, Vincent Vercruyse, Michel Goldman, et al. 2002. "*Trypanosoma cruzi* down-Regulates Lipopolysaccharide-Induced MHC Class I on Human Dendritic Cells and Impairs Antigen Presentation to Specific CD8 + T Lymphocytes." *International Immunology* 14 (10): 1135–44.
- Van Overtvelt, Laurence, Nathalie Vanderheyde, Valérie Verhasselt, Jamila Ismaili, Louis De Vos, Michel Goldman, Fabienne Willems, et al. 1999. "*Trypanosoma cruzi* Infects Human Dendritic Cells and Prevents Their Maturation: Inhibition of Cytokines, HLA-DR, and Costimulatory Molecules." *Infection and Immunity* 67 (8): 4033–40.
- Ventura-Garcia, Laia, Maria Roura, Christopher Pell, Elisabeth Posada, Joaquim Gascón, Edelweis Aldasoro, Jose Muñoz, et al. 2013. "Socio-Cultural Aspects of Chagas Disease: A Systematic Review of Qualitative Research." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (9). doi:10.1371/journal.pntd.0002410.
- Vitelli-Avelar, D. M., R. Sathler-Avelar, J. C.P. Dias, V. P.M. Pascoal, A. Teixeira-Carvalho, P. S. Lage, S. M. Elói-Santos, R. Corrêa-Oliveira, and O. A. Martins-Filho. 2005. "Chagasic Patients with Indeterminate Clinical Form of the Disease Have High Frequencies of Circulating CD3 +CD16 -CD56 + Natural Killer T

- Cells and CD4 +CD25 High Regulatory T Lymphocytes.” *Scandinavian Journal of Immunology* 62 (3): 297–308. doi:10.1111/j.1365-3083.2005.01668.x.
- Vitelli-Avelar, D. M., R. Sathler-Avelar, R. L. Massara, J. D. Borges, P. S. Lage, M. Lana, A. Teixeira-Carvalho, J. C.P. Dias, S. M. Elói-Santos, and O. A. Martins-Filho. 2006. “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?” *Clinical and Experimental Immunology* 145 (1): 81–92. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03123.x.
- Walker, Dawn M, Steve Oghumu, Gaurav Gupta, Bradford S Mcgwire, Mark E Drew, and Abhay R Satoskar. 2014. “Mechanisms of Cellular Invasion by Intracellular Parasites.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 71: 1245–63. doi:10.1007/s00018-013-1491-1.
- Weinkauf, Craig, Ryan Salvador, and Mercio Pereiraperrin. 2011. “Neurotrophin Receptor Trkc Is an Entry Receptor for *Trypanosoma cruzi* in Neural, Glial, and Epithelial Cells.” *Infection and Immunity* 79 (10): 4081–87. doi:10.1128/IAI.05403-11.
- Wherry, E. John, and Makoto Kurachi. 2015. “Molecular and Cellular Insights into T Cell Exhaustion.” *Nature Publishing Group* 15 (8). Nature Publishing Group: 486–99. doi:10.1038/nri3862.
- Wizel, B, M Nunes, and R L Tarleton. 1997. “Identification of *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase Family Members as Targets of Protective CD8+ TC1 Responses.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 159 (12): 6120–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9550413>.
- Zingales, Bianca, Michael A Miles, David A Campbell, Michel Tibayrenc, Andrea M Macedo, Marta M G Teixeira, Alejandro G Schijman, et al. 2012. “The Revised *Trypanosoma cruzi* Subspecific Nomenclature: Rationale , Epidemiological Relevance and Research Applications.” *Infection, Genetics and Evolution* 12 (2). Elsevier B.V.: 240–53. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.009.

Buenos Aires, Noviembre de 2017