

*Tesis de doctorado en Ciencias Químicas*

Infeción por *Trypanosoma cruzi*:  
participación del receptor para aril  
hidrocarburos (AhR) en la regulación de la  
respuesta inmune

Microbióloga Laura Fernanda Ambrosio

Córdoba-Argentina 2019



**Directora de Tesis:**

Dra. Claudia Cristina Motrán .....

**Comisión Asesora:**

Dra. Eva Acosta-Rodriguez .....

Dr. Gustavo Nores .....

Dra. Carolina Touz .....

**Evaluador Externo:**

Dr. Emilio Luis Malchiodi .....



*Este trabajo de tesis fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT-UNC) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FonCyT).*



## AGRADECIMIENTOS

**Cris Motrán:** te agradezco mucho Cris por recibirme con los brazos abiertos a pesar de que no nos conocíamos y yo no venía de esta universidad. Gracias por darme la oportunidad de ser parte de tu grupo de trabajo, sin eso no hubiera aprendido todo lo que aprendí ni conocido a las maravillosas personas que estuvieron conmigo todos estos años. Especialmente gracias por todo el esfuerzo que le ponés a tu trabajo, te considero un ejemplo de lo que debe aspirar a ser todo aquel que quiera dedicarse a la ciencia.

**Vulpixin:** sí, porque ya no tenés apellido para mí, solo sos. Que bueno que no huiste espantada el primer día que llegaste después del incidente en cultivo, y que bueno que nos volvimos a encontrar todas las veces que nos desencotramos, me hubiera perdido de muchas experiencias y estoy segura de que esto no hubiera sido lo mismo sin vos. Gracias por tu amistad, y gracias por dármele así, igual que como enfrentás cada desafío que te proponés conquistar, con todo tu ser. No, llores. Esto no es un amor de verano, esto es un amor como tu amor por la sopa, pa' toda la vida. Así que gracias por todos estos años y por los que vendrán.

**Coti:** mi compañera de experimentos hasta la madrugada. Fue genial compartir los días de experimentos con vos, siempre a mil pero nunca aburridas. Gracias por tu amistad y confianza, me enseñaste que puede estar bueno compartir las cosas que te pasan a pesar de que no sean las más hermosas. Nos vemos prontito.

**Fer, David:** Mi Sra. de las tinieblas, macabrín, ustedes fueron mis primeros amigos cuando llegué al CIBICI. Con ustedes hice mis primeros planes en Cba que fue juntarnos a merendar con un grupón, pues becarios precarizados. Me hicieron sentir bienvenida en un lugar que apenas conocía, ¡gracias! Me enamoré de su oscuridad, gracias por acoplarse a la mía.

**Facu, Fer, Cris:** el primer y segundo año creo que dormía más en sus casas que en la mía. Gracias por ponerle toda la onda cuando les pregunté si me podía sumar a su viaje, planificarlo fue hermoso, y hacerlo con ustedes mucho más. Facundo sos la mejor persona que existe para ver películas de terror y además el mejor amigo que existe para viajar y para quedarse quieto

también, es imposible aburrirse con vos. Pero aparte es envidiable como le buscás el lado positivo a todo. Gracias por tu amistad y por salvarme de las medusas, claramente que esto esté sucediendo te lo debo a vos. Fer y Cris, son de las personas más cálidas que conozco. Gracias por las charlas y los flasheos cuestionando el orden establecido de las cosas Canalículo, sos demasiado buena gente, “un tractorcito” en palabras de la Caro M. Gracias por los audios con canciones y poemas, Cris, porque con vos todo es bello, contagias tu amor por las pequeñas cosas; incluso es bello que me escribas desde ya sabemos dónde. Los quiero.

**Jime, Cin:** a pesar de que nos conocemos desde que entré creo que estos últimos años y todo lo vivido nos unieron más. Marida, gracias por la pasión con la que defendés las cosas en las que crees, por no cansarte jamás de explicar el por qué de lo que pensas y decís. Me llevó un tiempo pero lo entendí. Cin, que lindo compartir tiempo con vos en nuestras citas, más lindo que enojarse contestándole a Jorge. Gracias por ser mi aliada.

**Viqui:** cuando creía que con el 103 tenía cuerda para rato llegaste vos, callada y con cara de querer asesinar a alguien, fue amor a primera vista. Estoy totalmente convencida que no existe otro ser en la Tierra que se preocupe tanto por los demás como vos, por todos, y se siente. Gracias por ser mi compañera de películas de terror, compañera amante de los dinosaurios y aguerrida detractora de las pseudociencias. Pero por sobre todo gracias por tu amistad.

**Hermoso 103:** Es increíble cómo un grupo tan heterogéneo de personas se puede unir así. Sin duda conocerlos está en la lista de las mejores cosas que me pasaron. Amo lo dedicados que son al trabajo del lab, pero más amo su dedicación hacia el otro y cómo están siempre abiertos a debatir todo, todo está a la vista para ser discutido y solucionado; y creo que por eso funcionamos tan bien como grupo. Porque no hay rencores. El 2018 sin duda fue un año que nos movió mucho, nos llevó a cuestionarnos la sociedad en la que vivíamos y a cuestionarnos también el papel que cumplíamos nosotros. Fue, es y seguirá siendo hermoso vivir nuevas experiencias a su lado y mutar con ustedes.

Eva, Adri, Caro: gracias por toda la ayuda que me brindaron en estos años. Muchas gracias por compartir sus conocimientos con nosotros y por estar siempre dispuestas a dar una mano en lo que hiciera falta.

Cin, Fabio, Pilar, Dr. Serra: gracias por estar siempre dispuestos a ayudar en lo que pudieran, ya fuera un reactivo, un protocolo, un consejo o un lugar para trabajar.

Gracias a Ale, Pauli, Pilar, Lauri, Gabi, Ceci, Sole, Fabri, Diego y Viqui, por su invaluable trabajo. Por todo lo que me enseñaron, por su paciencia y por las charlas durante estos años.

Mer, Martín V., Tiz, Yesi, Pau, Agus, Ger, Martín G., Jon y Tere: Mis 日本語の友達, los encontré a mitad de este camino y fue genial, es genial. Son como mi 103 externo, siempre apoyando los sueños del otro, y ofreciendo su ayuda. Gracias por ser un cable a tierra y por sus palabras de aliento. Y a Tiz una genia de la vida que siempre me preguntaba por los ratones verdes que no eran verdes, la distancia no hace la diferencia cuando el afecto es tan grande.

A mi familia: Gracias má por escucharme, escucharme y escucharme, y creer en mí. Pá por recordar cada fecha importante. Los amo. Gracias Carlita por estar ahí siempre lista para recibirme con un abrazo y un mate, en estos años definitivamente te convertiste en la hermana mayor. Gracias por Santi y Jared, no hay cosa más hermosa que más pedacitos de vos en el mundo hermana. Ema y Euge mis hermanos adoptivos, gracias por todo el apoyo y por compartir sus anelos conmigo, por dejarme sumarme a sus proyectos y sumarse a los míos.

Yamilin: si estás leyendo esto ya pasé a mejor vida...



## Tabla de Contenido

RESUMEN.....	15
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS .....	17
INTRODUCCIÓN .....	19
Enfermedad de Chagas.....	21
Ciclo de vida del Trypanosoma cruzi y mecanismos de infección.....	21
La enfermedad de Chagas: Una problemática a escala local y global .....	24
Manifestaciones Clínicas y desarrollo de la patología .....	25
Respuesta Inmune frente a T. cruzi.....	28
Inmunidad innata .....	29
Inmunidad adaptativa .....	31
Regulación de la respuesta inmune .....	33
El Receptor para Aril Hidrocarburos.....	34
Estructura .....	34
Señalización AhR y mecanismos de regulación.....	36
Ligandos endógenos de AhR .....	39
AhR y el sistema inmune .....	43
Señalización de AhR en células T regulatorias .....	46
Señalización de AhR en células Th17.....	47
AhR y memoria inmune.....	49
Rol de AhR en infecciones .....	50
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	53
CONSTRUCCIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	55

OBJETIVOS .....	57
RESULTADOS I.....	61
ANTECEDENTES .....	63
La infección con Trypanosoma cruzi modula la expresión de AhR en esplenocitos y el nivel de ligandos en suero de manera diferencial en ratones Balb/c y B6.....	65
Los ratones Balb/c y B6 responden de manera diferente a ligandos débiles de AhR ...	69
CONCLUSIONES I.....	73
RESULTADOS II.....	75
Infección experimental con T. cruzi: Efecto de la activación de AhR in vivo sobre la modulación de la respuesta inmune.....	77
La activación de AhR mediante el ligando exógeno TCDD disminuye la resistencia del huésped a la infección experimental con Trypanosoma cruzi.....	78
La administración combinada de 3HK e ITE promueve la diferenciación de células Treg y tiene efectos perjudiciales sobre la inmunidad parásito específica .....	86
La señalización de AhR participa en el desarrollo la respuesta Th1 y mecanismos inmunoregulatorios generados durante la infección con T. cruzi .....	92
CONCLUSIONES II.....	99
RESULTADOS III.....	101
La señalización de AhR restringe la diferenciación de células T CD8+ de memoria durante la infección con T. cruzi .....	103
CONCLUSIONES III.....	109
RESULTADOS IV .....	111
Perfil diferencial de metabolitos del triptófano en plasma de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica.....	114
CONCLUSIONES IV .....	125

DISCUSIÓN .....	127
Animales de experimentación .....	149
Clasificación de sueros de pacientes infectados .....	150
Reactivos.....	151
Reactivos utilizados en cultivo celular.....	151
Reactivos utilizados en citometría de Flujo.....	151
Reactivos utilizados en la determinación de citoquinas por ELISA sandwich.....	151
Western Blot.....	152
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	152
Ligandos de AhR .....	152
Infección experimental con <i>T. cruzi</i> .....	153
Mantenimiento de <i>T. cruzi in vivo</i> .....	153
Parasitemia .....	153
Obtención y mantenimiento de <i>T. cruzi</i> para ensayos <i>in vitro</i> .....	153
Obtención de lisado total de <i>T. cruzi</i> .....	154
Modelos experimentales <i>in vivo</i> .....	154
Modelo de activación de AhR con el xenobiótico TCDD .....	154
Modelo de activación de AhR con 3HK e ITE.....	155
Modelo de infección en ratones congénicos AhR <sup>d</sup> .....	155
Obtención de plasma y suspensión de células de bazo de ratones .....	155
Obtención de plasma.....	155
Obtención de esplenocitos totales.....	155
Caracterización de poblaciones celulares mediante citometría de flujo .....	156
Expresión de moléculas de superficie .....	156

Expresión del factor de transcripción Foxp3.....	156
Determinación de células productoras de citoquinas.....	157
Lineas celulares y cultivos primarios.....	158
Cultivo primario de esplenocitos.....	158
Líneas celulares.....	158
Obtención de macrófagos y tratamientos .....	159
Obtención de macrófagos de peritoneo (MP) .....	159
Obtención de macrófagos derivados de médula ósea.....	159
Determinación de la traslocación de AhR al núcleo celular.....	159
Cuantificación de Citoquinas mediante ELISA sandwich.....	160
Expresión de proteínas mediante Western blot .....	161
Ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	161
Extracción de ADN.....	161
Extracción de ARN .....	162
qPCR para la cuantificación de ADN de <i>T. cruzi</i> .....	162
RT-qPCR para la cuantificación de la expresión de Cyp1A1 y AhR.....	162
Ensayo de luciferasa para detección de agonistas de AhR en plasma.....	163
Metabolómica dirigida .....	164
Análisis estadístico.....	164
BIBLIOGRAFÍA .....	167

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* representa un problema sanitario prioritario en nuestro país. En Argentina alrededor de 2 millones de personas se encuentran infectadas y se estima que cada año mueren unas 12000 debido al desarrollo de cardiopatía chagásica crónica (CCC). Si bien los mecanismos que llevan al desarrollo de CCC aún no se conocen con exactitud, se sabe que tanto la persistencia del parásito como la excesiva respuesta inmune inflamatoria generada por la infección poseen un rol fundamental en el desarrollo de la patología. La señalización mediada por el receptor de aril hidrocarburos (AhR), un factor de transcripción dependiente de la unión a ligando, es capaz de inducir la diferenciación de células T hacia un perfil de tipo regulatorio o inflamatorio, de acuerdo a la fuerza de activación del ligando y al microambiente de citoquinas. Durante la infección con *T. cruzi* aumenta la actividad de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) que cataboliza el Trp en metabolitos conocidos como kinureninas, capaces de actuar como ligandos de AhR, favoreciendo el desarrollo de una respuesta regulatoria. En este trabajo de tesis se estudió el efecto de la infección con *T. cruzi* sobre la modulación de la expresión de AhR y de sus ligandos agonistas, el rol de la señalización de AhR en la regulación de la respuesta inmune inflamatoria y el desarrollo de memoria inmunológica, y se analizó cómo la infección con *T. cruzi* modula la presencia de ligandos agonistas de AhR y de metabolitos del Trp en suero de pacientes infectados. Se determinó que la infección con *T. cruzi* modula de manera diferencial la expresión de AhR en ratones B6 y Balb/c y la generación de ligandos de AhR. En células de ratones B6 se observó durante la infección una rápida disminución de la expresión de AhR, menor capacidad de generar ligandos endógenos y de activar a AhR que la cepa Balb/c lo que podría contribuir a la menor capacidad para inducir células Treg y en general de controlar la respuesta inflamatoria observada ratones B6 luego de la infección con *T. cruzi*. La administración de ligandos de AhR durante la infección favoreció el desarrollo de la respuesta regulatoria en ratones B6. Sin embargo, la expansión de células T regulatorias en la fase aguda condicionó la aparición de la respuesta inmune protectora parásito específica perjudicando la resistencia del hospedador a la infección. Mediante la utilización de ratones con un AhR de baja respuesta a ligando (AhRd) se evidenció que la señalización AhR por ligandos generados durante

la infección condiciona el desarrollo de una óptima y robusta respuesta Th1 específica capaz de eliminar el parásito y su correcta contracción para evitar la inmunopatología. Así mismo, durante la infección con *T. cruzi*, AhR restringe la diferenciación de las células T CD8+ de memoria específica contra el parásito. Finalmente, en sueros de pacientes en la etapa crónica e individuos sanos se observó que durante la infección con *T. cruzi* y en los diferentes estadios de la Enfermedad de Chagas crónica se modula de manera diferencial los niveles de agonistas de AhR en suero y el perfil de metabolitos del triptófano. Pudiendo resultar algunos de estos metabolitos de utilidad como biomarcadores de la enfermedad o indicadores de severidad.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*, *Enfermedad de Chagas*, *AhR*, *respuesta inmune*.

## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

<b>3-HAA</b>	Ácido 3-hidroxiantranílico
<b>3-HK</b>	3-hidroxikinurenina
<b>ACP</b>	Análisis de componentes principales
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN copia
<b>AhR</b>	Receptor para aril hidrocarburos
<b>AhRR</b>	Represor del receptor para aril hidrocarburos, del inglés, <i>aryl hydrocarbon receptor repressor</i>
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ARNT</b>	Translocador nuclear del receptor para aril hidrocarburos, del inglés, <i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
<b>CCC</b>	Cardiopatía Chagásica Crónica
<b>CD</b>	Células dendrítica/s
<b>CMH</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>CP</b>	Componente/s Principal/es
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>CpG</b>	Citosina trifosfato seguida de guanina trifosfato
<b>ECG</b>	Electrocardiograma
<b>FICZ</b>	6-formilindol [3,2-b]carbazol
<b>Foxp3</b>	Del inglés <i>forkhead box P3</i>
<b>GAPDH</b>	Del inglés <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
<b>GOT</b>	glutámico oxálico transaminasa
<b>GPT</b>	glutámico pirúvico transaminasa
<b>IAAId</b>	indol-3-acetaldehído
<b>IAId</b>	Indol-3-aldheído

<b>IDO</b>	indolamina 2,3-dioxigenasa
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IND</b>	Indeterminada/o
<b>INF</b>	Infectado/s
<b>Ip</b>	Intraperitoneal
<b>IPA</b>	ácido indole-3-propionico
<b>ITE</b>	2(1'H-indol-3'-carbinol)-tiazol-4 carboxílico metil éster
<b>KAT</b>	Kinurenina aminotransferasa
<b>KMO</b>	Kinurenina 3-monooxigenasa
<b>KO</b>	Deficiente genéticamente, del inglés <i>knock-out</i>
<b>KYN</b>	Kinurenina
<b>KYNU</b>	Kinureninasa
<b>MDMO</b>	Macrófagos Derivados de Médula Ósea
<b>Mo</b>	Macrófago/s
<b>MP</b>	Macrófago/s de peritoneo
<b>NI</b>	No Infectado/s
<b>NK</b>	Células asesinas naturales, del inglés <i>natural killer</i>
<b>pi</b>	Post infección
<b>RT-PCR</b>	Del inglés <i>real time polymerase chain reaction</i>
<b>TA</b>	Triptamina
<b>TCDD</b>	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
<b>Th</b>	Linfocitos T colaboradores, del inglés <i>T helper</i>
<b>Th17</b>	Células T <i>helper</i> 17
<b>Tp</b>	Tripomastigotes
<b>Tr1</b>	Células T regulatorias tipo 1
<b>Treg</b>	Células T regulatorias Foxp3+
<b>Trp</b>	Triptófano
<b>TS</b>	Transialidasa
<b>WT</b>	Salvaje, del inglés <i>wild type</i>

# INTRODUCCIÓN



## Enfermedad de Chagas

### *Ciclo de vida del Trypanosoma cruzi y mecanismos de infección.*

Hace aproximadamente 110 años, Carlos Chagas describe al protozoario *Trypanosoma cruzi* como agente etiológico de la enfermedad que luego recibiría su nombre.<sup>1</sup> Sin embargo, a pesar de que este descubrimiento tuvo lugar tan solo en el siglo pasado, el parásito ha convivido con los humanos por más de 9000 años.<sup>2</sup>

Las primeras etapas del ciclo de vida de este protozoario involucran la colonización del intestino de insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae, siendo los principales vectores en el cono sur del continente americano las especies: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* y *Panstrongylus megistus*. Sin bien estos son los más comunes, todos los triatominos representan un peligro potencial como vectores de la enfermedad.<sup>3,4</sup>

El ciclo de vida del parásito se inicia cuando el insecto se alimenta de la sangre de un mamífero infectado en el que se encuentra la forma tripomastigote del parásito. Una vez en el tracto digestivo del insecto, el tripomastigote se diferencia al estadio epimastigote, y luego a tripomastigote metacíclico en la porción final del intestino del artrópodo. La infección en los mamíferos ocurre cuando el insecto se alimenta de su sangre y el hospedador entra en contacto con la forma infectiva del parásito (tripomastigote metacíclico) que es eliminada junto con las heces del insecto en el sitio en el que ocurrió la picadura. El ingreso del microorganismo puede producirse entonces a través de la herida generada por la picadura o incluso de una membrana mucosa intacta.<sup>3</sup> Una vez en el hospedador vertebrado, el parásito invade de manera local las células reticuloendoteliales y conectivas diferenciándose a su forma replicativa, amastigote, la cual comienza a dividirse por fisión binaria. Una vez que las células invadidas se encuentran repletas de parásitos, estos pasan a la forma tripomastigote, lisan las células y se liberan al torrente sanguíneo y a la linfa lo cual permite la invasión de tejidos alejados del sitio de inoculación (Figura I1). Si bien este parásito es capaz de invadir cualquier célula nucleada, tiene especial tropismo por las células del sistema nervioso, las musculares lisas, estriadas cardíacas y

estriadas esqueléticas. De igual manera, estudios recientes demostraron que el parásito también presenta tropismo por los adipositos.<sup>5</sup> Tanto el tejido adiposo marrón como el blanco son blancos tempranos de la infección, convirtiéndose en potenciales reservorios del parásito durante la etapa crónica de la infección en humanos y en ratón.<sup>5-7</sup>

La transmisión de tipo vectorial no es la única que existe. Otras formas de transmisión de la enfermedad a tener en cuenta son la transmisión congénita, el consumo de alimentos contaminados y la transfusión o trasplante de órganos de un donante infectado a uno sano, siendo los últimos dos casos de suma importancia para la transmisión en países no endémicos.<sup>8</sup>

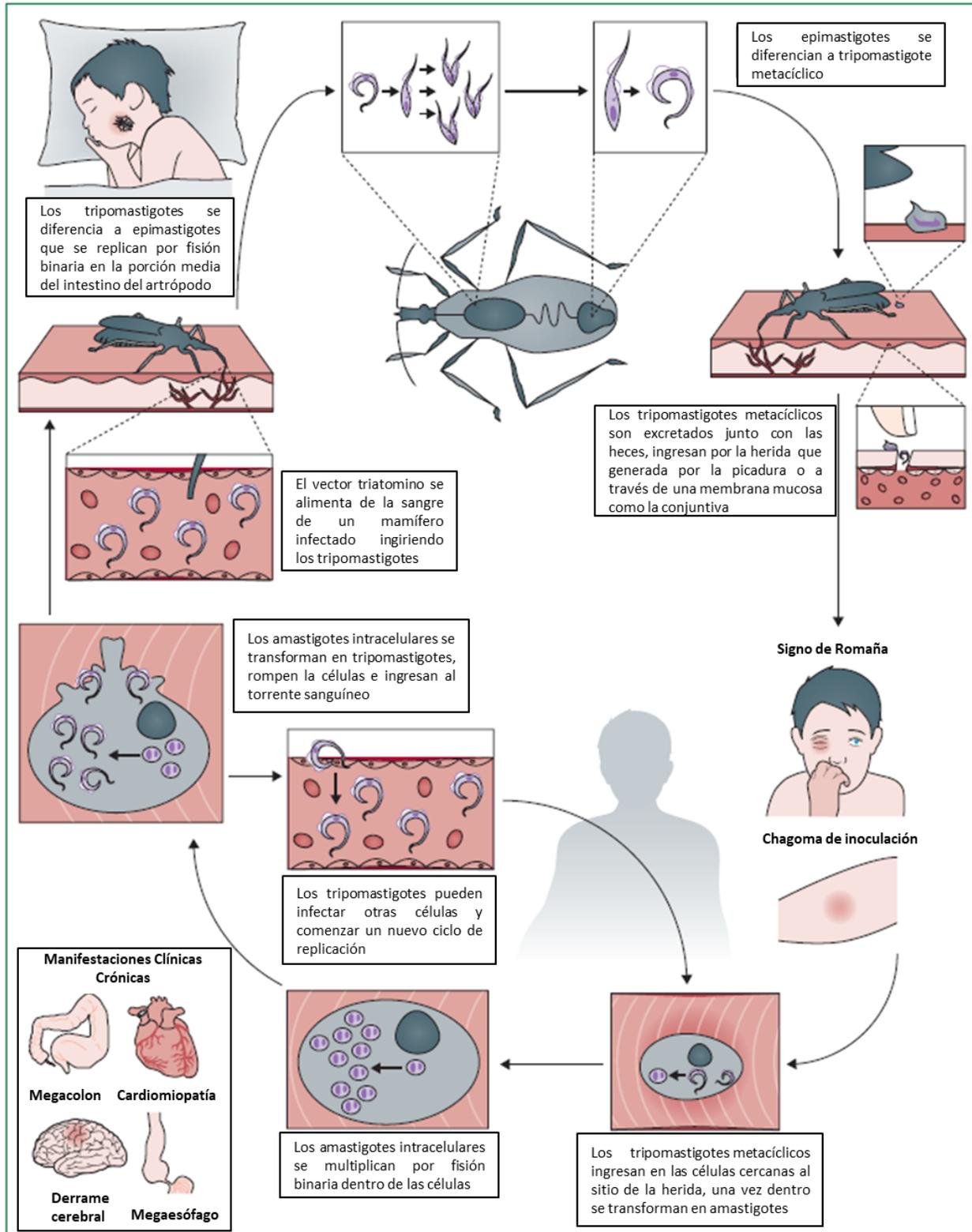


Figura I1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, transmisión vectorial. Adaptado de Perez-Molina y col (2018).<sup>8</sup>

## *La enfermedad de Chagas: Una problemática a escala local y global*

A pesar de haber transcurrido más de un siglo desde que se logró asociar a *T. cruzi* como causante de la enfermedad de Chagas, y de los esfuerzos realizados para combatirla, aún se la considera endémica en 21 países de América Latina. El área afectada abarca desde el Sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile.<sup>8,9</sup> De acuerdo a la actualización publicada por la Organización Mundial de la Salud, el país con mayor prevalencia de *T. cruzi* en la región es Bolivia con 6,1%, mientras que la prevalencia en Argentina se encuentra entre las más altas de la región 3,6%. Así mismo, Argentina y Bolivia dan cuenta del 30,62% de todos los nuevos casos de Chagas en Latinoamérica.<sup>9</sup> Esto se traduce en 5,7 millones de personas infectadas en la región, 38 mil casos nuevos por año y un número de muertes por año que ronda los 12 mil casos.<sup>4,8</sup>

Históricamente, las poblaciones más afectadas han sido aquellas de escasos recursos económicos, generalmente asentadas en áreas rurales. Los procesos de migración interna hacia las áreas urbanas, la transmisión congénita y la transfusión de sangre contaminada, entre otros factores, han sido los responsables de la transmisión de la enfermedad hacia áreas previamente no afectadas, probablemente estableciéndose ciclos urbanos en áreas periféricas. Los movimientos migratorios y la transmisión no vectorial han causado que la enfermedad se extienda más allá de sus límites geográficos naturales, convirtiéndose así en un problema de índole global (Figura 12).<sup>8</sup> Debido al desconocimiento de la patología por parte de los profesionales de la salud en regiones no endémicas, los casos de cardiopatía chagásica no siempre son reconocidos y las mujeres que presentan riesgo de transmitir la enfermedad a sus hijos son rara vez monitoreadas.<sup>4</sup> En relación a las transfusiones, la legislación europea evita que las personas con historial de Enfermedad de Chagas sean donantes. Sin embargo, la mayor parte de los individuos infectados son asintomáticos y desconocen su estado.



Figura 12. La enfermedad de Chagas un problema a escala local y global. Corrientes migratorias desde América Latina y distribución global de los casos de Chagas.<sup>10</sup> Imagen de Tosello Boari J. (2015).<sup>11</sup>

### *Manifestaciones Clínicas y desarrollo de la patología*

La enfermedad de Chagas puede dividirse en dos etapas: una etapa aguda y una crónica. Se considera que la etapa aguda inicia cuando los parásitos circulantes son detectables en sangre mediante microscopía, alrededor de 1-2 semanas después de la transmisión vectorial.<sup>12,13</sup> Esta etapa suele transcurrir de forma asintomática aunque puede presentarse sintomatología leve como fiebre y malestar, además de hepatoesplenomegalia, linfocitosis atípica e inflamación en el sitio de inoculación (chagoma) o edema palpebral unilateral (signo de Romaña), cuando el sitio de inoculación es la conjuntiva ocular. La etapa aguda solo se desarrolla de manera severa en alrededor del 1 al 5% de los casos, pudiendo presentarse miocarditis aguda, derrame pericárdico y meningoencefalitis, siendo las manifestaciones de este tipo más comunes en individuos inmunocomprometidos y aquellos infectados mediante transmisión oral.<sup>4,8,13</sup>

Una vez que se desarrolla la respuesta inmune adaptativa celular y humoral y se comienza a controlar la carga parasitaria, la etapa se resuelve de manera espontánea en un periodo de 4-8 semanas y la parasitemia disminuye de manera notable a partir del día 90 post infección (pi).<sup>4,8</sup> Este periodo en el que el número de parásitos circulantes se encuentra en

niveles no detectables mediante microscopía, pero permanecen en los tejidos en su forma amastigote, se denomina etapa crónica de la infección.<sup>13</sup> El 60-70% de los pacientes que llegan a la etapa crónica de la enfermedad no desarrollan síntomas. Se dice que estos individuos transcurren una fase “indeterminada” (IND), tienen buena prognosis y se caracterizan por ser seropositivos para *T. cruzi*, no presentar síntomas clínicos a nivel cardíaco ni digestivo y presentar electrocardiograma y radiografía de tórax normales.<sup>8,14</sup> Sin embargo, e incluso cuando los estudios corrientes no evidencian la presencia de miocarditis, es posible que pacientes clasificados como IND presenten una miocarditis subclínica. Así, *T. cruzi* ha sido hallado en biopsias endomiocárdicas de pacientes no diagnosticados con enfermedad cardíaca, y tanto en humanos como en animales de experimentación se han documentado cambios patológicos como degeneración de miocitos, infiltrado inflamatorio y fibrosis.<sup>15-17</sup>

La progresión de los pacientes crónicos con la forma indeterminada de la enfermedad hacia alguna de las formas clínicas, más comúnmente la miocardiopatía dilatada, es de alrededor del 1,85 al 7% anual. Se considera que alrededor del 30 al 40% de los pacientes crónicos, luego de 10 a 30 años de la primoinfección, presentarán manifestaciones clínicas cardíacas, digestivas (megaesófago y megacolon) o cardiodigestivas.<sup>8,18</sup> Además, la reactivación de la enfermedad puede ocurrir en pacientes crónicos inmunocomprometidos, tal como aquellos infectados con HIV o que están bajo tratamiento con drogas inmunosupresoras.<sup>19</sup>

Las manifestaciones clínicas de tipo gastrointestinal son menos comunes que las cardíacas y se evidencian mayormente en individuos pertenecientes a países del cono sur (Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Paraguay), considerando que estas diferencias geográficas están ligadas a la prevalencia de distintas variedades genotípicas de las cepas de *T. cruzi* en el norte (TcI) y al sur (TcII, V y VI) del Ecuador.<sup>13</sup>

La patología cardíaca es la afección más frecuente y la más severa que desarrollan los pacientes en la etapa crónica de la infección, siendo las diversas alteraciones de carácter estructural y funcional consecuencia de tres procesos clave como inflamación, muerte celular y fibrosis. Entre los signos iniciales más comunes se encuentran el bloqueo de rama derecha y del fascículo anterior izquierdo del haz de His y alteraciones segmentarias de la motilidad de la pared del ventrículo izquierdo. Entre las manifestaciones tardías se incluyen la disfunción del

nódulo sinusal que lleva al desarrollo de bradicardia severa, bloqueo auriculoventricular, taquicardia ventricular sostenida o no sostenida, extra sístole ventricular compleja, cardiopatía dilatada progresiva con insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma apical, embolia debido a la formación de trombos en el ventrículo izquierdo dilatado y aneurisma. La muerte súbita es la principal causa de decesos entre los pacientes con Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC), seguido de la falla cardíaca refractaria y tromboembolismo.<sup>8</sup> De acuerdo a la organización mundial de la salud, Argentina registra el mayor número de casos de CCC (376.309 casos), lo cual se corresponde con el 32,13% de los casos registrados en América Latina.<sup>9</sup>

Los mecanismos de patogénesis de la CCC no se conocen por completo. Sin embargo, distintos estudios en pacientes IND y CCC mostraron que los individuos en la fase IND presentan una respuesta inmune de tipo regulatorio mientras que en los pacientes con CCC predomina un perfil inmune de características inflamatorias. En efecto, monocitos/macrófagos (Mo) de pacientes IND cultivados en presencia de *T. cruzi* presentan un perfil regulatorio con alta producción de la citoquina anti inflamatoria IL-10 y baja expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA-DR) mientras que los provenientes de pacientes CCC se caracterizan por producir TNF.<sup>20</sup> Resultados similares se evidenciaron al estimular células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con lisado de *T. cruzi*; los pacientes con CCC presentan un mayor porcentaje de células productoras de IFN- $\gamma$ , la mayor parte de las cuales expresan los marcadores de superficie CD3 y CD4+ (perfil Th1), en relación a los IND que además presentan un mayor porcentaje de células productoras de IL-10. Los autores sugieren que los individuos IND mantienen niveles altos de IL-10 y bajos de IFN- $\gamma$  por lo que no desarrollarían CCC.<sup>21</sup>

Esta diferencia en la respuesta inmune entre individuos de una misma especie se puede observar también entre las cepas de ratón C57BL/6 (B6) y Balb/c, presentando la primera mayor capacidad de controlar la parasitemia, con 6 veces menos cantidad de parásitos en sangre en el pico de la parasitemia que los Balb/c, mayores niveles de TNF y menores niveles de IL-10 circulante. Además, la mayor respuesta inflamatoria en los ratones B6 se asocia a un incremento en la mortalidad, mayor daño hepático e infiltrado inflamatorio, lo que se encontraría asociado a un desbalance entre mediadores pro- y anti-inflamatorios. Estos

resultados sugieren que individuos de una misma especie pueden presentar una mayor susceptibilidad a la infección o a la inmunopatología asociada a la infección, lo que señala la importancia del componente genético de cada individuo.<sup>22</sup> Entonces, al igual que lo observado en los pacientes con CCC, los ratones B6 no son capaces de controlar de manera eficiente la respuesta inflamatoria lo que derivaría en el posterior daño tisular ocasionado más por la respuesta inflamatoria que por la carga parasitaria.

Por otro lado, distintos estudios sugieren que la persistencia del parásito en los tejidos estaría asociada con la severidad de la enfermedad. En este sentido, el análisis de corazones provenientes de pacientes que cursan la etapa crónica de la enfermedad mostró que en el 58% de las secciones de tejido estudiadas se evidenciaba la presencia de antígenos de *T. cruzi*, y que este porcentaje ascendía al 100% en los fragmentos que mostraban miocarditis severa, mientras que en la mayor parte de los casos en los que el infiltrado inflamatorio se encontraba ausente o era leve, no se hallaron parásitos.<sup>23</sup> En trabajos más recientes se observó que en muestras de autopsia de pacientes IND y con CCC la carga parasitaria, determinada mediante cuantificación de la presencia del ADN parasitario por PCR, se correlaciona con la presencia de cardiomiopatía.<sup>24</sup>

Entonces, la incapacidad de controlar la respuesta inflamatoria, sostenida debido a la persistencia del parásito e influenciada tanto por factores relacionados con el hospedador como con el microorganismo, jugaría un rol preponderante en la patogénesis de esta enfermedad.<sup>4,25</sup>

### *Respuesta Inmune frente a T. cruzi*

En el control de la infección por *T. cruzi* se ven involucradas distintas poblaciones celulares y mediadores solubles que intervienen activamente para controlar la replicación del parásito, entre ellos podemos mencionar a las células de la inmunidad innata y adaptativa como los linfocitos Natural Killer (NK), macrófagos (Mo), células dendríticas (CD), linfocitos B, linfocitos T CD4+ y CD8+ y las citoquinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12.

Sin embargo, como resultado de los miles de años de coevolución parásito-hospedador, *T. cruzi* ha desarrollado diversos mecanismos para evadir esta respuesta sin perjudicar de manera crítica al hospedador, favoreciendo así el establecimiento de una infección crónica. Esta adaptación explicaría en parte por qué la respuesta del sistema inmune frente al microorganismo no es lo suficientemente efectiva como para eliminarlo por completo.<sup>26</sup>

### Inmunidad innata

El reconocimiento inicial de *T. cruzi* por los macrófagos y otras células de la inmunidad innata se encuentra mediado por los receptores tipo Toll (TLR) que reconocen una variedad de ligandos exógenos.<sup>27</sup>

El parásito expresa en su superficie grandes cantidades de glicoinositol fosfolípidos (GIPL), que pueden encontrarse como GIPL anclados a membrana o en su forma libre. Estas moléculas son reconocidas por los receptores TLR2 y TLR4, respectivamente.<sup>28,29</sup> El ARN y el ADN parasitario, que contiene abundantes motivos CpG, son reconocidos por TLR7 y TLR9 que se localizan en el citoplasma.<sup>30</sup> En primera instancia la señal se transmite a través del dominio citoplasmático de los TLR, Toll/IL-1R. Posteriormente, se produce el reclutamiento de diferentes mediadores citoplasmáticos, entre ellos MyD88, que activan la cascada de señalización que resulta en la activación del factor nuclear inducible  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) y la consecuente producción de citoquinas inflamatorias.<sup>31</sup>

Los Mo y células dendríticas (CD) que han contactado con el parásito comienzan a producir IL-12 y TNF en el caso de los Mo (Figura I3).<sup>32</sup> La IL-12 es censada por otra población celular de la inmunidad innata, las células NK que mediante la liberación de perforinas y granzimas y la inducción de apoptosis mediada por Fas-L destruyen las células infectadas. Estas células también contribuyen con el control de la parasitemia mediante la eliminación de parásitos libres a través de un mecanismo independiente de perforinas.<sup>33</sup> Además, las células NK luego de recibir la señalización por IL-12, comienzan a producir IFN- $\gamma$  lo que las convierte en las principales productoras de esta citoquina en los estadios tempranos de la infección. El IFN- $\gamma$  participa en la activación de los Mo induciendo la expresión de la enzima óxido nítrico inducible

(iNOS) con la consecuente producción de óxido nítrico (ON), uno de las principales moléculas efectoras de la muerte de los parásitos intracelulares.<sup>33,34</sup> A su vez, el TNF producido por los Mo funciona como una señal autócrina que estimula y sostiene la producción de ON en los Mo activados, contribuyendo a la acción trypanocida.<sup>35,36</sup> La internalización de *T. cruzi* por los Mo promueve la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) entre ellos los radicales libres del oxígeno ( $O_2^-$ ), generados por el complejo NADPH oxidasa, los cuales reaccionan con ON para producir peroxinitritos ( $ONOO^-$ ) una molécula altamente oxidante y citotóxica, capaz de dañar la integridad de membrana y la funcionalidad de las proteínas parasitarias, resultando también efectivas en la eliminación de *T. cruzi*.<sup>37</sup>

Por otro lado, el IFN- $\gamma$  favorece la expresión y la inducción de la actividad catalítica de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), la cual se expresa en altos niveles en CD y Mo y es la encargada de catabolizar el aminoácido esencial triptófano (Trp).<sup>38</sup> La degradación de este aminoácido da lugar a un fenómeno conocido como privación de Trp, que afecta el crecimiento de ciertos patógenos intracelulares como *Chlamydia* sp y *Toxoplasma gondii*.<sup>39,40</sup> En este sentido, Knubel y colaboradores demostraron que 3-hidroquinurena (3-HK), uno de los metabolitos generados por IDO, posee un efecto tóxico directo sobre diferentes formas del parásito induciendo cambios morfológicos y alteraciones en la movilidad que repercuten en su capacidad infectiva y de replicación.<sup>41</sup>



del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) tipo I y II a las células de la inmunidad adaptativa T CD8+ y T CD4+, respectivamente.

Una vez que contactaron con el antígeno, los linfocitos T CD8+ se activan y adquieren su función citotóxica para así eliminar células infectadas, mientras que los linfocitos T CD4+ pueden diferenciarse en distintas subpoblaciones de células T colaboradoras o T *helper* (Th). Esta diferenciación es el resultado de la expresión de un programa transcripcional característico dictado por las señales recibidas de las CPA y el microambiente de citoquinas presentes. Las células T vírgenes pueden adquirir un fenotipo Th2 cuando son estimuladas en presencia de IL-4. Estas células se caracterizan por la producción de citoquinas como IL-4, IL-5 e IL-13.<sup>18</sup> Por otro lado, las citoquinas IL-12 e IFN- $\gamma$  secretadas por las CPA y las células NK luego de la infección, crean un microambiente que favorece la diferenciación de las células T CD4+ vírgenes hacia un fenotipo Th1. Precisamente, la respuesta de tipo Th1 junto con la elevada y sostenida producción de IFN- $\gamma$  constituyen una de las características inmunológicas distintivas de la infección por *T. cruzi*.<sup>42</sup> La contribución de la actividad microbicida del IFN- $\gamma$  por las células de la inmunidad adaptativa se encuentra asociada al aumento de la expresión de iNOS e IDO y la producción de ON y catabolitos del Trp por los Mo, como se describió sucede en la inmunidad innata.<sup>43</sup> Diversos estudios realizados en modelos murinos confirman la importancia de los componentes de la respuesta Th1 para lograr un efectivo control del parásito en la etapa aguda. En este sentido, se ha reportado que la administración de IFN- $\gamma$  recombinante a ratones infectados reduce la mortalidad e inmunosupresión observada en la etapa aguda.<sup>44</sup> En congruencia con estos hallazgos, experimentos realizados en ratones deficientes en IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  KO), en su receptor (IFN $\gamma$ R KO) o en IL-12 (IL-12 KO) muestran mayor parasitemia, severidad histopatológica y mortalidad que los ratones salvajes (WT).<sup>45,46</sup>

Además, la infección lleva a la activación policlonal de los linfocitos B y alrededor de dos semanas luego de la infección comienza a generarse la respuesta de anticuerpos específicos capaces de opsonizar al parásito para favorecer su fagocitosis y mediar la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.<sup>47</sup> Así, durante la etapa aguda de la infección, las células B juegan un papel importante en el reclutamiento de las células CD4+ y CD8+ al

bazo y en la generación y mantenimiento de las poblaciones de células de memoria y efectoras.<sup>48</sup>

Por otro lado, debido a que durante el ciclo de vida de *T. cruzi* en mamíferos predomina la forma intracelular amastigote, los linfocitos T CD8+ resultan muy importantes para el control del parásito por su capacidad de reconocer células infectadas y eliminarlas.<sup>49</sup> En este sentido, la eliminación de las células T CD8+ en ratones infectados con *T. cruzi*, lleva al incremento de la carga parasitaria en corazón, tanto en la etapa aguda como crónica, por lo que su rol resultaría crítico a lo largo de toda la infección.<sup>50,51</sup> En concordancia, modelos de infección utilizando ratones deficientes en la proteína  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2-microglobulina KO), los cuales no poseen células T CD8+, ya que la expresión de esta proteína se encuentra asociada a los productos del loci de MHC-I que son de vital importancia para la selección positiva de las células T CD8+ en timo, son más susceptibles a la infección, presentando parasitemias más elevadas que los WT y una muerte prematura.<sup>52,53</sup>

### Regulación de la respuesta inmune

Si bien la resistencia durante la infección experimental con *T. cruzi* depende fuertemente de la rápida inducción de una respuesta inflamatoria de tipo Th1 y la expansión de la población de células T CD8+, debe poder generarse una respuesta regulatoria adecuada capaz de controlar la respuesta inflamatoria; ya que la producción exacerbada de mediadores inflamatorios se encuentra relacionada con el desarrollo de inmunopatología y asociada a un estadio clínico de mayor severidad.<sup>21,54</sup> Entre las células con actividad regulatoria capaces de controlar la respuesta de tipo Th1 se encuentran las células T regulatorias CD4+ CD25+ Foxp3+ (que de ahora en más se denominarán como Treg).

Se ha reportado que los pacientes categorizados como IND presentan un mayor porcentaje de células Treg en sangre periférica que los pacientes con CCC, lo que podría indicar la participación de esta población en el control del daño tisular y el posterior desarrollo de cardiopatía.<sup>55,56</sup> Además, se ha observado que los ratones B6 que desarrollan una importante respuesta inflamatoria de tipo Th1 no son capaces de expandir la población

de células Treg mientras que sufren una gran expansión de células T efectoras, lo que da como resultado un incremento en la relación de células T efectoras/Treg y patología hepática inflamatoria.<sup>57,58</sup> Por otro lado, en los modelos de infección desarrollados en ratones Balb/c se observa un perfil de respuesta de tipo Th2 y una expansión de la población de células Treg (resultados no publicado), mostrando estos ratones un control más eficiente de la respuesta inflamatoria pero menos eficiente de la replicación parasitaria que los ratones B6.<sup>59</sup> En esta cepa la muerte en la etapa aguda se produce debido a que la respuesta inmune generada resulta ineficiente para controlar la replicación parasitaria. En este sentido, recientemente dos diferentes grupos han reportado el limitado desarrollo de la población Treg en la infección con *T. cruzi* resulta crítico para permitir el desarrollo de la respuesta T CD8+ protectora.<sup>57,60</sup>

Así, se podría hipotetizar que la severidad de la inmunopatología inducida por *T. cruzi* podría ser controlada mediante la regulación del balance entre células T efectoras y Treg, y que las acciones enfocadas a modificar este balance podrían representar estrategias terapéuticas prometedoras.

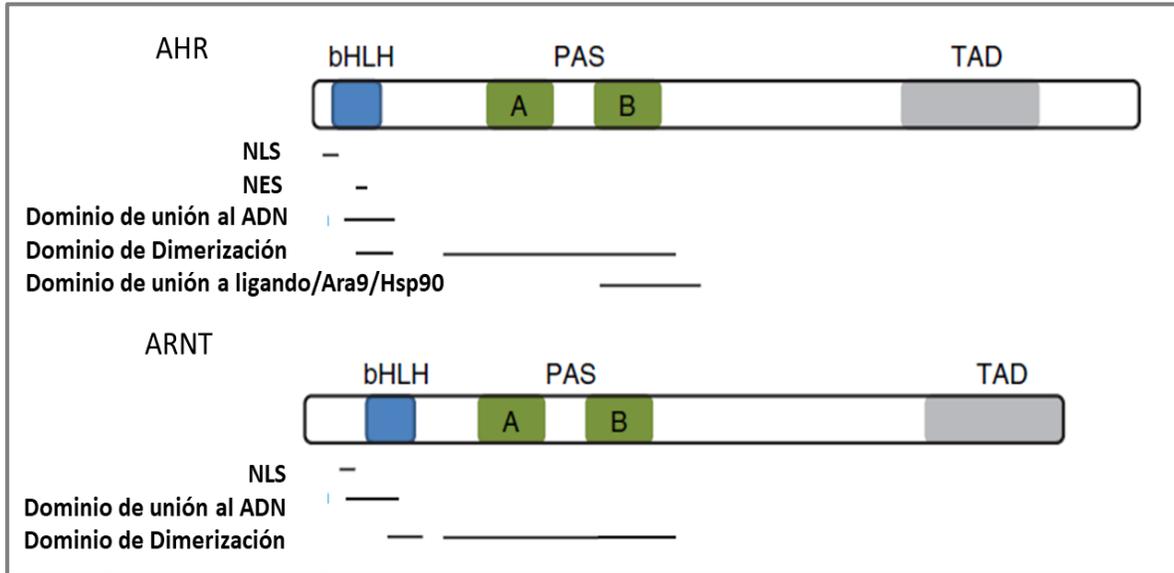
## El Receptor para Aril Hidrocarburos

El receptor para aril hidrocarburos (AhR), es un factor de transcripción citoplasmático dependiente de unión a ligando. Análisis filogenéticos muestran que homólogos de este gen se encuentran presentes en todos los grupos vertebrados y en varios invertebrados, entre ellos artrópodos (*D. melanogaster*) y nematodos (*C. elegans*).<sup>61,62</sup>

### *Estructura*

AhR pertenece a la superfamilia de proteínas Per-Arnt-Sim (PAS). En la estructura del receptor se destacan 3 regiones: la porción N-terminal hélice-bucle-hélice básica, del inglés *basic helix-loop-helix* (bHLH), que le confiere la capacidad de interactuar con el ADN y ayuda

en el proceso de dimerización, la región PAS que interviene en la dimerización, interacción con moléculas chaperonas y en la unión del receptor a sus ligandos y por último una porción C-terminal variable donde se encuentra una región rica en glutamina a la cual se unirán los factores de transactivación para favorecer la transcripción de sus genes blanco. (Figura I4).<sup>63-65</sup>



**Figura I4. Estructura y dominios de AhR y ARNT.** La secuencia de localización nuclear (NLS) y la secuencia de exportación nuclear (NES) se encuentran dentro de la región bHLH, así como también el dominio de unión al ADN. El dominio PAS media la heterodimerización y unión de moléculas chaperonas. La región C-terminal es variable, contiene el dominio de transactivación (TAD) responsable de activar la transcripción luego de su unión al ADN. (Imagen adaptada de Stevens y col. 2009)

Los miembros de esta superfamilia funcionan como sensores ambientales y se los ha asociado con diversas respuestas adaptativas asociadas a estímulos como la regulación del ciclo circadiano, la respuesta a hipoxia y la regulación de la respuesta metabólica y tóxica frente a determinadas moléculas de pequeño tamaño. Las respuestas generadas en estas vías de señalización se producen luego de que las proteínas PAS sensan variaciones en el ambiente en el que se encuentran, tales como cambios en las condiciones de luz, modificaciones en los niveles de oxígeno y la exposición a xenobióticos u otros compuestos de estructura similar.<sup>66</sup>

## *Señalización AhR y mecanismos de regulación*

La vía de señalización de AhR que ha sido estudiada más extensivamente es la denominada “vía de señalización canónica” e involucra la interacción de AhR con secuencias consenso presentes en el promotor de sus genes blanco, favoreciendo así la transcripción de éstos.

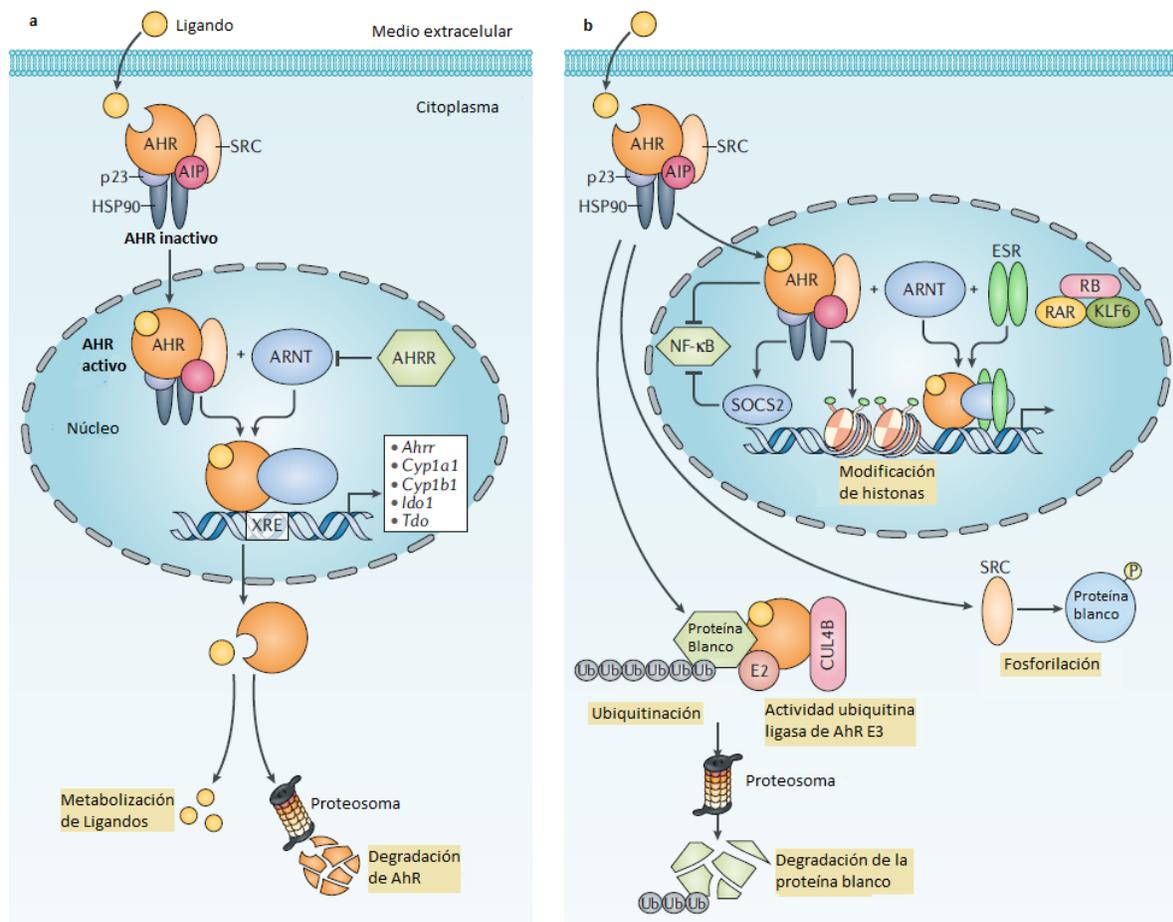
En ausencia de ligandos, AhR se encuentra en el citoplasma de la célula formando un complejo junto a las moléculas chaperonas heat shock protein 90 (HSP90), P23, la proteína 9 asociada al receptor para aril hidrocarburos (ARA9, también llamada AIP o XAP2) y también se ha reportado que puede interactuar con otras proteínas citoplasmáticas como la quinasa SRC (Figura 15).<sup>67</sup> Cada una de estas proteínas cumple un rol específico: HSP90 mantiene al receptor en una conformación que permita la mayor afinidad de unión con los ligandos mientras previene su migración al núcleo, P23 estabiliza la interacción AhR-HSP90-ARA9 favoreciendo la señalización de AhR por inhibir su ubiquitinación y degradación, mientras que SRC estaría involucrada en los primeros procesos luego de la activación de AhR, interactuando con moléculas blanco mediante la fosforilación de las mismas.<sup>68-70</sup>

Una vez que un ligando ha ingresado a la célula se une al receptor favoreciendo un cambio conformacional en el complejo de proteínas que expone la secuencia de localización nuclear (NLS) de AhR posibilitando su migración al núcleo. Una vez allí la proteína translocadora nuclear de AhR (ARNT) estimula la liberación de AhR del complejo de moléculas chaperonas e interactúa con AhR mediante la región PAS, formando un heterodímero.<sup>71</sup> Luego, el complejo AhR:ARNT se une a secuencias conservadas en el ADN denominadas elementos de respuesta a dioxinas o también elementos de respuesta a xenobióticos (DRE o XRE). La interacción con estas secuencias se encuentra asociada a la transcripción de diversos genes, entre ellos los genes de la denominada “batería de genes de AhR” se consideran un marcador de la activación de AhR. Este grupo de genes incluye enzimas que intervienen en la fase I y II del metabolismo de xenobióticos siendo de vital importancia en el proceso de detoxificación. Entre estas proteínas se encuentran la citocromo P450 (CYP) 1A1, CYP1A2, CYP1B1, familia glucuroniltransferasa 1

polipéptido A6 (UGT1A6), NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1 (Noq), Aldehído deshidrogenasa (Aldh3a1) y glutatión S-transferasa (GST-Ya).<sup>72</sup>

Además del sistema de chaperonas que impide la traslocación inespecífica de este receptor al núcleo, la actividad de AhR se encuentra regulada por otras moléculas. Una de ellas es la proteína represora de AhR (AhRR) que se transcribe junto con la batería de genes de AhR. Algunos estudios indican que AhRR es capaz de unirse a ARNT y que la inhibición en la actividad de AhR se debe a que esta molécula impide su unión a los sitios XRE mediante el reclutamiento de corepresores.<sup>73,74</sup> El otro mecanismo de regulación consiste en la eliminación mediante proteosoma de las moléculas de AhR que se encuentran libres en el citoplasma luego de su salida del núcleo.<sup>70</sup> El hecho de que la señalización de AhR se encuentre regulada negativamente por dos mecanismos independientes podría implicar que ha existido una selección evolutiva que controla la sobreexpresión de la batería de genes que se generan luego de la activación AhR.

En la señalización de tipo “no canónico” la actividad de AhR no se encuentra asociada a su unión a sitios XRE en el ADN. El receptor es capaz de interactuar con secuencias presentes en la región promotora de distintos genes mediante su asociación con los factores de transcripción que se unen específicamente a estas regiones. Así, AhR puede controlar la actividad de estos factores de transcripción, ya sea de manera directa o indirecta modulando su señalización.<sup>52</sup> Además, se ha descrito que AhR posee actividad de ubiquitina E3 ligasa, por lo que puede ubiquitinar proteínas favoreciendo su posterior degradación vía proteosoma, controlando su biodisponibilidad y por ende interfiriendo en su señalización. Esta función compete con su función canónica de factor de transcripción y el hecho de que actúe de una u otra manera depende en parte de la disponibilidad de ARNT.<sup>57,77</sup>



**Figura 15. Señalización AhR y mecanismos de regulación.** **a.** Vía de señalización canónica. AhR se encuentra de forma inactiva en el citoplasma unida a chaperonas que lo mantienen inactivo y previenen su degradación por proteosomas. Al unirse a un ligando, el complejo se trasloca al núcleo donde forma un heterodímero con ARNT y se une a secuencias XRE del ADN. **b.** Vía de señalización no canónica. Luego de unir ligando, AhR puede interactuar con otros factores de transcripción y modular así la actividad de estos. Así, puede modular la acción del factor de transcripción pro-inflamatorio NF- $\kappa$ B en forma directa e indirecta. Además, AhR funciona como una E3 ubiquitina ligasa favoreciendo la degradación por el proteosoma de proteínas blanco. Por otro lado, luego de liberarse de su complejo con chaperonas, la activación de AhR inicia cascadas de fosforilación dependientes de la quinasa SRC. CUL4B, complejo ubiquitina ligasa cullin 4B; ESR, receptor de estrógeno; KLF6, factor tipo Krüppel-like; RAR, ácido retinóico; RB, proteína del retinoblastoma; SOCS2, supresor de la señalización de citoquinas tipo 2; Ub, ubiquitinación. (Imagen adaptada de Rothhammer y col. 2019).<sup>70</sup>

## *Ligandos endógenos de AhR*

AhR fue descubierto al intentar dilucidar los mecanismos que median la toxicidad del 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (TCDD), un producto secundario formado en la síntesis de herbicidas que se determinó era el causante de los brotes de cloracné observados en trabajadores de esta industria química luego de exposición accidental. Fue bajo este contexto que se determinó que los efectos tóxicos observados son mediados por AhR y que TCDD funciona como su ligando.<sup>78</sup> Luego se caracterizaron otros ligandos de alta afinidad que incluían moléculas tóxicas y químicos hidrofóbicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), bifenilos policlorados (PCB), dioxinas halogenadas y compuestos relacionados.<sup>79,80</sup> Sin embargo, al considerar factores como la alta tasa de conservación evolutiva del receptor, las anomalías fisiológicas observadas en ratones que expresan un gen de AhR no funcional, la expresión temprana durante el desarrollo fetal de genes que poseen sitios DRE, y el hecho de que a pesar de que los ortólogos de AhR presentes en invertebrados se encuentran altamente conservados no son capaces de unirse a TCDD, ligando de activación prototípico en mamíferos, se pone de manifiesto la importancia a nivel fisiológico de este receptor, así como también la existencia de ligandos endógenos capaces de activarlo.<sup>81</sup>

Entre las fuentes de ligandos endógenos se encuentran aquellos derivados de la dieta. Los vegetales crucíferos como brócoli, repollo de Bruselas y coliflor, contienen abundante cantidad de compuestos de base indólica que luego de sufrir transformaciones enzimáticas en el organismo son capaces de actuar como agonistas de AhR.<sup>82</sup> Otros fitoquímicos como índigo e indirubina se han descrito como ligandos y han sido detectados en orina.<sup>82</sup> Se propone que estos compuestos pueden originarse de manera endógena mediante la actividad de CYP1A1 (enzima del citocromo P450 inducida por actividad de AhR); sin embargo, considerando la concentración en la que se encuentran en circulación y su EC<sub>50</sub>, éstos podrían no ser de relevancia como ligandos endógenos a nivel fisiológico.<sup>81,83</sup> Por otro lado, productos generados por la metabolización de los grupos Hemo presentes en la hemoglobina, tales como bilirrubina y biliverdina, son capaces de activar AhR e inducir la transcripción de *Cyp1a1*.<sup>84,85</sup> Los ecosanoides y prostaglandinas, metabolitos derivados del metabolismo del ácido araquidónico, como la

lipoxina 4A y la prostaglandina G2, también llevan a la transcripción de *Cyp1a1*.<sup>86,87</sup> A su vez la activación de AhR favorece la transcripción ciclooxigenasa 2 (COX-2), enzima que participa en la formación de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico, lo que lleva al aumento de la cantidad de ligandos disponibles.<sup>88,89</sup>

Las vías de metabolización del Trp constituyen la fuente de ligandos de AhR con mayor potencial como ligandos endógenos. Entre los circuitos metabólicos encargados del catabolismo del Trp se encuentran la vía de la serotonina, de la triptamina, de la melatonina y la vía de las kinureninas. Esta última es la principal vía de degradación del Trp en mamíferos y da cuenta del 95% de la degradación de este aminoácido y por ende es la que genera mayor cantidad de catabolitos.<sup>90</sup> Bajo condiciones fisiológicas, alrededor del 90% de la degradación de Trp tiene lugar en el hígado, proceso que es realizado por la enzima triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO), la cual se encuentra en el primer paso de la degradación del Trp en la vía de las kinureninas. Existe además una vía extrahepática, controlada por la enzima indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO). Si bien la contribución de IDO a la degradación del Trp es alrededor del 10-15%, la relevancia de la vía aumenta considerablemente bajo condiciones de activación inmune. Esto se debe principalmente a que el IFN- $\gamma$  generado bajo dichas condiciones induce la expresión de la enzima IDO incrementando su transcripción de 20 a 4000 veces, convirtiendo a la vía de las kinureninas catabolizada por IDO en uno de los mayores controladores de la biodisponibilidad de Trp en condiciones inflamatorias.<sup>91</sup> Se ha reportado que varios de los ligandos producidos en la vía de las kinureninas, tales como L-kinurenina (KYN), 3-HK, ácido kinurénico, ácido cinabarínico y otros derivados de las demás vías de degradación del Trp son ligandos de AhR.<sup>92-</sup><sup>95</sup> Los estudios de interacción de AhR con ligandos muestran que los que presentan mayor afinidad de unión son compuestos planos, alargados, con ramificaciones laterales, con una región media pequeña y con potenciales sitios de unión a puentes de hidrógeno en la región media.<sup>97</sup> KYN no parece obedecer a esta configuración y los análisis computacionales realizados para comprender cómo esta molécula se une al receptor no lograban explicar su capacidad de unión a AhR.<sup>92,96</sup> Recientemente, se han identificado dos derivados que se generan espontáneamente a partir de KYN y que actúan como ligandos de alta afinidad siendo activos a concentraciones en el orden de picomolar. Estos compuestos recibieron la denominación

TEACOPs (trace-extended aromatic condensation products) y sus estructuras coinciden con las predichas por los modelos computacionales. Así, la existencia de estas moléculas derivadas de KYN podría explicar por qué un compuesto que presenta una estructura tan diferente a la clásica es capaz de llevar a la activación de AhR.<sup>96</sup> En este sentido, es importante mencionar que una característica importante de las proteínas PAS es poseer una estructura flexible denominada “belt” en su sitio de unión a ligando, que en el caso de AhR es más larga y flexible lo que le confiere capacidad de unirse a un gran número de ligandos con estructuras relativamente distintas.<sup>96</sup>

Se han descrito otros ligandos de AhR derivados del Trp. Entre los más estudiados se encuentra el 6-formilindol [3,2-b]carbazol (FICZ) un fotoproducto generado en piel por la incidencia de luz ultravioleta en el Trp, que lleva a la apertura de su anillo indol. Una de las características por la que se considera importante a FICZ es su alta afinidad de unión a AhR, siendo la constante de unión de este ligando muy similar a la de TCDD. Sin embargo, estudios recientes utilizando condiciones de irradiación UV cercanas a los valores reales a los que estamos expuestos, mostraron que FICZ representa tan sólo un 0,03% de los productos generados en forma fisiológica.<sup>97</sup> Otro compuesto generado a partir del Trp, es 2(1'H-indol-3'-carbinol)-tiazol-4 carboxílico metil éster (ITE), el cual proviene de la condensación del Trp con cisteína.<sup>98</sup> Este ligando aislado originalmente de pulmón de cerdo, presenta al igual que FICZ alta afinidad de unión con el receptor, además durante los ensayos de competencia realizados con [<sup>3</sup>H]-TCDD demostró capacidad de unirse a isoformas de AhR de distinto origen: humana, murina, de zebrafish y killifish.<sup>98</sup> Además, se ha reportado que posee funciones inmunoregulatorias y anticancerígenas,<sup>99-102</sup> lo cual sumado al hecho de que no es tóxico, lo convierten en una molécula con gran potencial para ser utilizada en el desarrollo de nuevas terapias. Por otro lado, una de las incógnitas que se plantea respecto a este ligando es si existe como tal en el tejido de mamíferos, ya que debido a las condiciones del medio utilizado para aislarlo, la cual involucró el uso de altas temperaturas y condiciones ácidas es posible que ITE sea un subproducto generado durante este proceso.<sup>98</sup>

La metabolización del Trp por los microorganismos que conforman la microbiota representa también otra fuente de ligandos endógenos. Bacterias como *Escherichia coli*,

*Clostridium* spp. y *Bacteroides* spp. poseen la enzima triptofanasa que convierte el Trp de la dieta en indol que posteriormente puede ser transformado en el hígado en indoxil 3-sulfato (I3S), molécula que se ha reportado es capaz de activar AhR.<sup>103,104</sup> Otra vía metabólica que genera ligandos de AhR involucra la conversión del Trp en triptamina (TA) o en ácido indol-3-acético (IAA), mientras que este último por descarboxilación dará lugar a la formación del 3-metil-indol, también llamado escatol.<sup>82,103</sup> El indol-3-aldehído (IAld), ácido indole-3-propionico (IPA), indol-3-acetaldehído (IAAld), son también productos del metabolismo microbiano que han sido identificados como ligandos de AhR.<sup>82,103</sup> Otro grupo de metabolitos producidos por bacterias comensales involucrados en interacciones huésped-microbiota son los ácidos grasos de cadena corta, que se originan por fermentación de fibras de la dieta, indoles y de la degradación del Trp.<sup>105</sup> Estudios en los que líneas celulares humanas y murinas fueron cultivadas en presencia de butirato, acetato o propionato mostraron que estos ácidos grasos favorecen la expresión de genes asociados a la actividad de AhR, entre ellos *Cyp1a1*, *Cyp1b1* y *Ahrr*. Además, al cultivar estas células en presencia de ligandos de AhR, como TCDD, indol o TA, se observó un incremento en la expresión de genes asociados a AhR. Cabe destacar que no todos los ácidos grasos fueron capaces de aumentar la transcripción de los genes analizados en el mismo rango, sino que es dependiente del contexto celular.<sup>106</sup> En concordancia, un estudio reciente sugiere que butirato sería un ligando de AhR, ya que en ensayos *in vitro* utilizando líneas celulares de células epiteliales humanas se observó que es capaz de activar AhR y genes relacionados, independientemente de su actividad como inhibidor de la histona deacetilasa. Además, aumenta la translocación de AhR al núcleo y disminuye la señal del sistema reportero asociado a luciferasa que indica actividad de AhR al agregar un inhibidor de AhR.<sup>105</sup> Recientemente, nuevos productos de origen microbiano han sido caracterizados como ligandos de AhR, entre ellos el ácido 1,4-dihidroxi 2-naftalónico (1,4 DHNA) el cual es un intermediario en la biosíntesis de la vitamina K2 y se sabe que es producido también por *Propionibacterium freudenreichii* y *Lactobacillus casei*.<sup>107</sup> De manera interesante, en modelos de colitis inducida por dextran sulfato (DSS) se observó que la administración de 1,4 DHNA por vía oral antes y después de inducir la enfermedad mejora la supervivencia y el grado de daño histológico que presentan los ratones.<sup>108</sup>

Compuesto	Origen	Compuesto	Origen
Endógenos		Endógenos	
• Indol-3-carbinol (I3C)	Dieta	• 6-formilindol [3,2-b]carbazol (FICZ)	Metabolismo del hospedador
• 3,3'-diindolmetano (DIM)		• 5-hidroxitriptófano (5HTP)	
• Indol (3,2-b) carbazol (ICZ)		• Bilirrubina	
• 2-(indol-3-ilmetil)-3,3'-diindolilmetano		• Bilieverdina	
• Indol-3-acetonitrilo		• Lipoxina A4	
• Curcumina		• Prostaglandina	
• Diosmina		• Índigo	
• Indol	Microbioma	• Indirrubina	Levaduras/hongos
• Ácido indol 3-acético		• Triptantrina	
• Indol 3-aldeído (IAId)		• Malassezina	
• Triptamina		Exógenos	
• 3-indoxil sulfato (I3S)		• 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)	Contaminantes halogenados y policíclicos (PAH/HAH)
• 3-metil indol (escatol)	• Beta-naftoflavona	Sintéticos	
• Kinurenina (Kyn)	• Omeprazol		
• Ácido kinurénico (KA)	• VAF347		
• Ácido xanturénico	• 4-hidroxitamoxifeno (4OHT)		
• Ácido cinabarinico	• 6-metil-1,3,8-triclorodibenzofurano		
• 2(1'H-indol-3'-carbinol)-tiazol-4 carboxílico metil éster (ITE)	Metabolismo del hospedador		

Tabla I1. Agonistas de AhR. Adaptado de Shinde y col (2018).<sup>109</sup>

### AhR y el sistema inmune

Desde que se describió por primera vez el rol de AhR como mediador de los efectos tóxicos de TCDD y su papel como activador de la transcripción de genes asociados a la metabolización de dioxinas, se han atribuido diversas funciones a la señalización AhR. Entre ellas, su activación resulta fundamental en el desarrollo del sistema circulatorio, que se evidencia en las anomalías presentadas en ratones AhR KO, tales como la inhabilidad para cerrar el ducto venoso hepático, hipertrofia cardíaca, hipertensión, niveles elevados de vasoconstricción e inmunosupresión como resultado de anomalías en la hematopoyesis.<sup>110–</sup>

<sup>112</sup> Por otro lado, la señalización AhR en respuesta al ambiente y compuestos endógenos observada en células innatas linfoides de tipo 3 (ILC3) localizadas en la lámina propia del intestino es necesaria para su desarrollo y para la producción de la citoquina IL-22. La interacción de IL-22 con su receptor, presente en células epiteliales intestinales, es crucial para la secreción de péptidos antimicrobianos y la producción de mucina que contribuyen a la integridad de la barrera intestinal e impiden la diseminación periférica de bacterias comensales

y promueven el mantenimiento de la homeostasis.<sup>113</sup> Además, se ha reportado que compuestos indólicos derivados del metabolismo del Trp por microorganismos comensales del género *Lactobacillus* inducen la producción de IL-22 a través de su unión con AhR presente en células ILC3.<sup>114</sup> AhR se expresa además en otras células de la inmunidad innata como las CD, Mo y NK como también en algunas células que participan en la respuesta inmune adaptativa como algunos linfocitos T CD4+, CD8+ o células B.<sup>115,116</sup>

En células T la magnitud de la expresión del receptor es variable siendo las células Th17, Treg y las células T regulatorias de tipo 1 (Tr1), que se caracterizan por producir grandes cantidades de IL-10, las que lo expresan en mayores niveles. En contraste, las células CD4+ vírgenes y los linfocitos Th1 y Th2 muestran una expresión muy baja de este receptor.<sup>117-119</sup> Así, la activación de AhR afecta a las células de la inmunidad adaptativa, modulando su diferenciación y función de manera directa o indirecta a través de las CPA.<sup>115</sup>

Entre otros factores, la diferenciación de las células T se encuentra condicionada por el microambiente de citoquinas. Así, las células Treg requieren de TGF- $\beta$  para la expresión del factor de transcripción Foxp3, asociado a su función reguladora, mientras que las Th17 murinas productoras de IL-17 requieren TGF- $\beta$ 1 e IL-6; la IL-6 inhibe la expresión de Foxp3 y junto con TGF- $\beta$ 1 inducen la señalización necesaria para su diferenciación en Th17, por su parte IL-21 e IL-23 se encuentran involucradas en el mantenimiento y expansión de la población. Estudios realizados en un modelo de encefalitis autoinmune experimental (EAE) han mostrado que la activación de AhR con TCDD o ITE favorece la diferenciación de células Treg y la reducción de la severidad de la enfermedad, mientras que la administración del ligando FICZ interfiere con la diferenciación de esta población y favorece la generación de células Th17, agravando la enfermedad.<sup>117</sup> Estos resultados indican que, dependiendo del ligando, AhR es capaz de regular tanto la diferenciación de células Treg como Th17 y esta señalización participaría entonces en la regulación del balance Treg/Th17. En este sentido, recientemente se ha reportado que las células Th17 se pueden transdiferenciar hacia células Tr1 productoras de IL-10, y así las células Tr1 “exTh17” no solo producen las mismas citoquinas y poseen los marcadores celulares característicos de las células Tr1 *bonafide*, sino que su conversión a Tr1 se encuentra asociado con una reprogramación de su perfil trascricional. La citoquina TGF- $\beta$ 1 sería clave en el proceso

de transdiferenciación mediante la inducción de SMAD3, molécula que inhibe la actividad del factor de transcripción característico de las células Th17 ROR $\gamma$ t. Pero además, la incorporación de FICZ en cultivos de células Th17 diferenciadas *in vitro* (con TGF- $\beta$  e IL-6) aumenta el porcentaje de células Tr1, por lo que la activación de AhR favorece la transdiferenciación de los linfocitos Th17 a Tr1.<sup>120</sup>

El hecho que diferentes ligandos de AhR puedan inducir la diferenciación a diferentes subtipos de células T (Treg, Tr1 o Th17), ha sido una incógnita por muchos años. Entre los factores que podrían explicar estas diferencias se encuentran: la afinidad de unión del ligando al receptor dada por la constante de disociación ( $K_D$ ) que puede variar desde el rango de pM (ligandos fuertes) hasta  $\mu$ M (ligandos débiles) y la potencia del ligando que se encuentra relacionada a su biodisponibilidad, tiempo de ocupación del receptor y farmacocinética (FICZ y TCDD poseen  $K_D$  similares, pero difieren en estructura y tiempo de metabolización siendo de 10-11 días para TCDD y de horas para FICZ).<sup>121,122</sup> Respecto a la segunda hipótesis, Elrich y col. han demostrado recientemente que la duración de la activación de AhR determina el destino de las células T CD4+.<sup>123</sup> Ellos utilizan un modelo de inmunización con células alogénicas para evaluar el efecto de diferentes dosis de TCDD (resistente a la metabolización: sostenida activación de AhR) y FICZ o ITE (rápidamente metabolizados: activación AhR transitoria) sobre la respuesta alogénica aguda, y observan que cuando la dosis de FICZ utilizada logra una inducción de *Cyp1a1* equivalente a la de TCDD ambos compuestos favorecen la inducción de células T regulatorias (Tr1 o Treg dependiendo del tiempo analizado), mientras que a dosis bajas de todos los compuestos no se inducen Treg y aumenta el porcentaje de células CD4+ productoras de IL-17.<sup>123</sup> Por otro lado, Boule y col.<sup>124</sup> demostraron en un modelo de infección con el virus Influenza A, que diferentes ligandos de AhR (FICZ, ITE, PCB126 y TCDD) son capaces de modular la respuesta inmune frente al virus favoreciendo o inhibiendo el desarrollo de determinadas poblaciones celulares pero que estas diferencias se vuelven más moderadas en ratones *Cyp1a1* -/- donde se reduce el metabolismo de estos ligandos. Estos trabajos apoyan la noción de que diferencias en la afinidad de unión, la duración de la señal y eventos moleculares asociados a la interacción ligando-AhR, como los productos del metabolismo de los ligandos por CYP1a1, influyen el resultado de la activación de AhR sobre la respuesta inmune.

## Señalización de AhR en células T regulatorias

La administración de determinados ligandos de AhR, entre ellos TCDD e ITE, favorece la diferenciación de células T vírgenes a células Treg y este aumento en la frecuencia de células Treg ha sido asociado a la supresión de diversas enfermedades de base inmunológica entre ellas la EAE, enfermedad de Crohn, uveoretinitis y alergia alimentaria.<sup>117,125-129</sup> Además, se ha observado que el desarrollo de células Treg a partir de células T vírgenes cultivadas con TGF- $\beta$  (condiciones polarizantes a Treg) en presencia de TCDD o FICZ disminuye de manera significativa cuando las células T vírgenes provienen de animales AhR KO.<sup>130</sup>

Los mecanismos mediante los cuales AhR favorece la diferenciación de las células Treg es aún tema de estudio. La evidencia indica que la señalización AhR regula de manera directa la expresión del factor de transcripción Foxp3, necesario para la diferenciación y función supresora de estas células, mediante su unión a sitios DRE presentes en la secuencia promotora de este gen y que además media la desmetilación parcial del promotor de Foxp3, favoreciendo así el acceso de la maquinaria transcripcional (Figura I6).<sup>117,128,131</sup> Además, AhR es capaz de controlar la actividad de factores de transcripción que influyen en el desarrollo de las células Treg. Así, la activación de AhR favorece la producción de TGF- $\beta$  que lleva a la traducción de SMAD1 que en células Treg humanas estabiliza la expresión de Foxp3, previene la activación de STAT1 que puede inhibir el desarrollo de esta población celular y favorece la expresión de Aiolos que suprime la expresión de genes asociados con la respuesta efectora.<sup>99,130,132,133</sup>

AhR afectaría además la diferenciación de la población de células Treg a través de sus efectos sobre las CD. Por un lado, se ha reportado que CD de bazo procedentes de ratones tratados con el ligando endógeno ITE presentan marcadores de superficie y un perfil de citoquinas de características tolerogénicas, y que CD derivadas de médula ósea estimuladas con este compuesto muestran una mayor capacidad para polarizar células T hacia un perfil regulatorio con expresión de Foxp3.<sup>99</sup> Así mismo, el efecto observado con ITE se debe en gran medida a la mayor producción de ácido retinoico, el cual promueve la diferenciación de las células Treg.<sup>99,134</sup>

La expresión de AhR en CDs es necesaria para la expresión de la enzima IDO.<sup>135</sup> A su vez, las kinureninas que se generan como consecuencia de esta activación son ligandos de AhR y favorecen la diferenciación de células Treg.<sup>92,96,136</sup> Estos datos, en conjunto con los expuestos anteriormente, indicarían que la señalización a través AhR podría controlar la diferenciación de células T mediante la modulación de la expresión de moléculas clave asociadas al perfil de células Treg o a través de las CDs.

Las células Tr1 por su parte llevan a cabo su actividad regulatoria mediante la producción de IL-10, entre otros mecanismos. La IL-27, producida por CPA activadas, favorece el desarrollo y expansión de las células Tr1 mediante la inducción de la producción de IL-21 que actúa como un factor de crecimiento autócrino y contribuye a la estabilidad de la población Tr1, mientras que IL-27 inhibe el desarrollo de las células Th17 y Treg.<sup>137,138</sup>

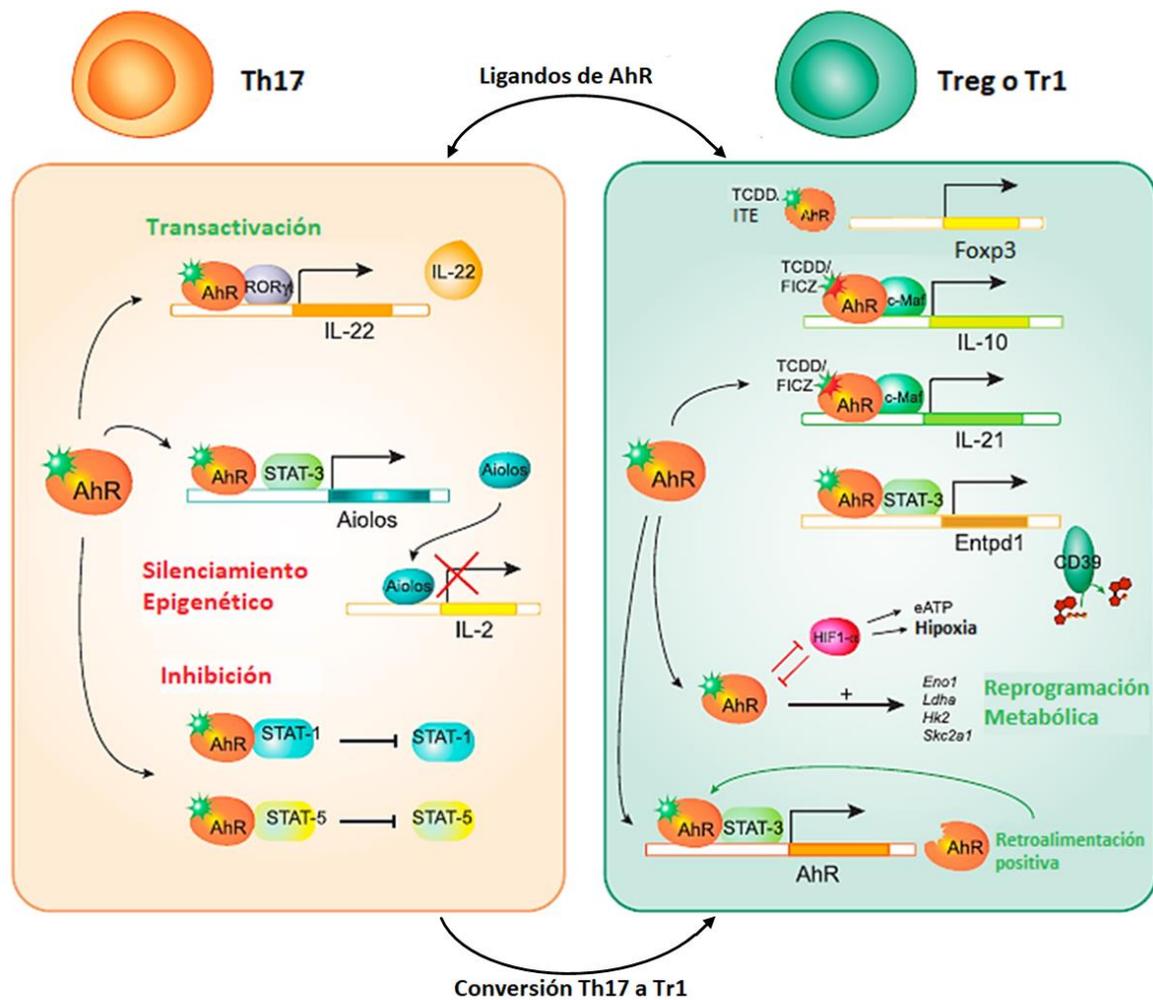
Se ha demostrado que en cultivos de células T bajo condiciones polarizantes Tr1, la IL-27 aumenta la expresión de AhR que se une al factor de transcripción c-maf y actúa de manera sinérgica mediante la unión a los promotores de los genes de IL-10 e IL-21 favoreciendo su transcripción y de esta manera el desarrollo de las células Tr1 (Figura I6).<sup>139</sup> Además, bajo estas mismas condiciones, STAT3 y AhR se unen al promotor del gen que codifica para CD39 aumentando su expresión. CD39 cataliza la síntesis del compuesto antiinflamatorio adenosina, disminuyendo el ATP extracelular (eATP) que inhibe la diferenciación a Tr1. El eATP aumenta la expresión de HIF-1 $\alpha$  que se une a ARNT compitiendo con AhR, mediando así la ubiquitinación del receptor y posterior degradación en proteosoma. Por otro lado el complejo STAT3-AHR se une al promotor de AhR favoreciendo su transcripción en un mecanismo de retroalimentación positiva.<sup>140</sup>

### Señalización de AhR en células Th17

Los linfocitos Th17 participan de la respuesta inmune contra bacterias extracelulares y hongos y contribuyen a la patología de diversas enfermedades autoinmunes. Las células Th17 requieren para su diferenciación la presencia de TGF- $\beta$  en combinación con IL-6 o IL-21 en ratón y se caracterizan por la producción de IL-17A y la expresión el factor de transcripción ROR $\gamma$ t.<sup>82</sup>

Se ha reportado que la expresión de AhR aumenta durante la diferenciación de las células Th17 y que su interacción con proteínas STAT es importante en la diferenciación de estas células. Así, la inducción de STAT1 por IFN- $\gamma$  e IL-27 y de STAT5 por IL-2 inhiben la polarización Th17, y se ha demostrado que es AhR el que interacciona con ambas proteínas impidiendo su activación.<sup>130</sup> Por otro lado, AhR y STAT3 inducen la expresión de Aiolos, que modifica el estado epigenético del promotor de *Il2* limitando su accesibilidad a factores de transcripción y silenciando la expresión de IL-2 en estadios tempranos de la diferenciación Th17, periodo donde los efectos inhibitorios de IL-2 sobre la diferenciación a Th17 son detectados (Figura I6).<sup>141</sup> Por otro lado, bajo condiciones polarizantes Th17 la activación de AhR aumenta la expresión de *Il17a*, *Il17f* e *Il22*, mientras que en células T CD4+ provenientes de ratones AhR KO la producción de IL-17A e IL-17F disminuye y la de IL-22 resulta indetectable, probablemente debido a que AhR facilita el reclutamiento de ROR $\gamma$ t al promotor de IL-22 y favorece su transcripción.<sup>113,118,142</sup>

Si bien se ha observado que el incremento de células Th17 mediado por la activación de AhR favorece el desarrollo de patologías como la EAE, también se ha reportado que la activación AhR por bilirrubina no conjugada en un modelo de colitis favorece la conversión hacia un perfil menos patogénico resultado de un aumento en la expresión de CD39, involucrada en la síntesis de adenosina (anti-inflamatoria) y la inducción de Tr1 mediante la disminución de eATP.<sup>117,143</sup> Es importante destacar la influencia del medio ambiente en que se produce la activación de AhR para la inducción de células Th17, así en presencia de IL-23 la activación de AhR induce la diferenciación de células Th17 con características patogénicas, mientras que en ausencia de este estímulo AhR podría favorecer la generación de células Th17 con actividad anti-inflamatoria o su conversión hacia Tr1.<sup>120,144</sup>



**Figura 16.** Señalización de AhR en células T. La activación de AhR en células Th17, Treg y Tr1 regula procesos transcripcionales asociados con su diferenciación y estabilización, ya sea mediante la transactivación de genes o el silenciamiento o inhibición de la transcripción o la actividad de otras moléculas como las proteínas STAT. Adaptado de Gutierrez-Vazquez y col (2017).<sup>82</sup>

### AhR y memoria inmune

El sistema inmune adaptativo posee dos roles fundamentales: montar una respuesta inmune específica luego del encuentro con el antígeno y generar memoria inmunológica de larga vida, capaz de responder de manera rápida y eficaz en caso de una reinfección.

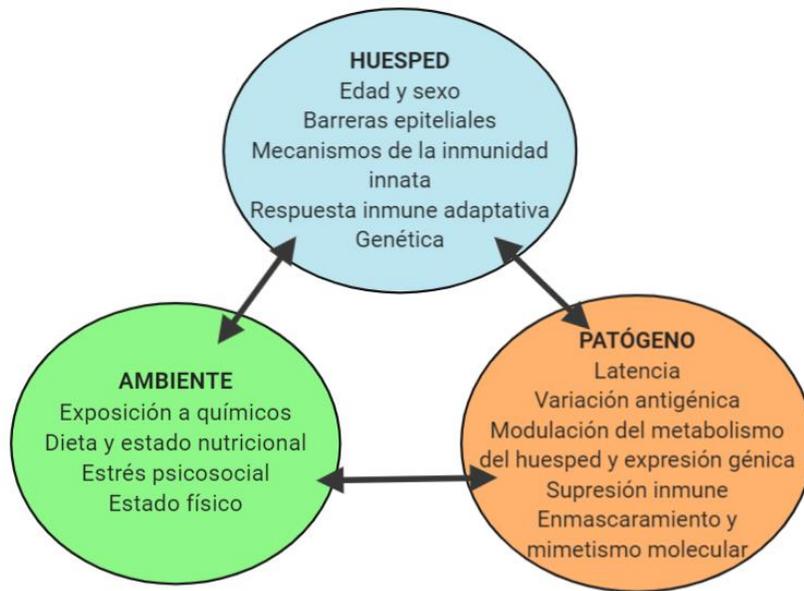
Estudios epidemiológicos que analizan el efecto de la exposición prenatal a dioxinas y compuestos bifenílicos policlorados (PCB) sobre el desarrollo de la respuesta humoral generada

por la vacunación en la etapa de la niñez, muestran que la presencia de estos compuestos en suero, leche y la dieta de la madre se correlacionan con una menor generación de respuesta de anticuerpos luego de recibir la vacuna contra el sarampión y el tétanos.<sup>145-147</sup> Por otro lado, en un modelo de infección con el virus de la Influenza A se observó que la activación de AhR mediante la administración de TCDD inhibe la expansión, diferenciación y producción de IFN- $\gamma$  en células T CD8+ específicas, así como también el desarrollo de la respuesta inmune de memoria. Sin embargo, se ha demostrado que la activación de AhR solo afecta la respuesta de memoria en la fase inicial de su desarrollo y no es capaz de modular la respuesta de memoria una vez adquirida, por lo que los eventos que ocurren durante la inducción de las células T CD8+ serían el blanco de la activación AhR. Así, teniendo en cuenta la baja expresión de AhR en las células T CD8+, los autores proponen que la señalización AhR que desfavorece el desarrollo de células de memoria es la que ocurre en las CPA.<sup>148,149</sup>

### *Rol de AhR en infecciones*

Existen diversos factores que determinan la resistencia del hospedador frente a una infección. Entre ellos, las características del propio hospedador tales como edad, sexo, genética y respuesta inmune; las señales ambientales que incluyen exposición a químicos y la dieta; y las características del microorganismo patógeno, como la variación antigénica que presentan, mecanismos de evasión, expresión génica, entre otros.<sup>150</sup>

En este sentido, es posible establecer ciertas conexiones entre AhR y cada uno de los factores mencionados. Primero, situándonos a nivel del huésped, se ha establecido que existen polimorfismos de AhR, es decir, variaciones en la secuencia de este gen, que determinan una mayor o menor afinidad del receptor por sus ligandos. Los efectos de estas variaciones se ven reflejados en la señalización del receptor afectando así los distintos procesos en los que se encuentra involucrado, entre ellos, los relacionados a la respuesta inmune.<sup>117,151</sup> Por lo que en un mismo contexto de ligandos podrían generarse diferentes respuestas que llevarían a una evolución distinta luego de una infección.



**Figura 16. Interacciones huésped-ambiente-microorganismos.** Las características del huésped y del patógeno influyen el resultado de las infecciones. Otros factores menos estudiados que modulan el desarrollo de la infección mediante su interacción con el huésped y el patógeno son los relacionados con el ambiente.

En cuanto a su interacción con el ambiente, la expresión del receptor es mayor en aquellos órganos que sirven como primera barrera de defensa frente a contaminantes ambientales, tales como piel, pulmón e intestino. En este último, su expresión en poblaciones celulares de la inmunidad innata como CDs e ILC3 es importante para mantener la tolerancia y la integridad de la mucosa, así como también para la generación de estructuras inmunes postnatales como los *cryptopatches* (grupos de células ILC3 rodeadas por CDs) en lámina propia.<sup>152</sup> Además, como se mencionó anteriormente, algunos de los ligandos de AhR son de origen exógeno o son generados en el organismo mediante reacciones fisiológicas propias o de la microbiota a partir de precursores presentes en los alimentos.

En relación a los microorganismos patógenos, se ha reportado que AhR es capaz de censar factores de virulencia pertenecientes a *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium tuberculosis*, actuando así como un receptor intracelular de reconocimiento de patógenos.<sup>153</sup> Por otro lado, se ha demostrado que CDs en estado de reposo expresan constitutivamente niveles muy bajos de AhR, pero incrementan la expresión de este receptor cuando son

estimuladas por ligandos de TLR4 (LPS) o TLR9 (CpG), indicando que la señalización a través de estos TLR participa en la expresión del receptor.<sup>135</sup>

El papel de AhR en la respuesta inmune frente a infecciones ha sido estudiado en infecciones con diversos patógenos, y generalmente empleando modelos de activación con TCDD y ratones AhR KO. En estos modelos, se ha demostrado que la activación de AhR puede resultar tanto en beneficio como en detrimento del huésped. En el modelo de infección con *Leishmania major*, una única dosis de TCDD administrada antes de la infección disminuye el tamaño de las lesiones cutáneas presentadas por los ratones mientras que no afecta su supervivencia.<sup>154,155</sup> Por otro lado, en modelos de infección con el virus *Influenza A* así como también *Coxsackievirus B3*, el tratamiento con TCDD previo a la infección produce un aumento en la morbilidad y mortalidad de los ratones infectados.<sup>156-158</sup> Además, un trabajo reciente ha demostrado que distintos ligandos de AhR modulan de manera diferencial, de acuerdo a la potencia del ligando y a los productos catabólicos formados, la respuesta inmune frente a la infección con el virus *Influenza A*. Al igual que en trabajos anteriores, la respuesta generada por un ligando particular como FICZ no es igual en el contexto de la EAE o de la infección con este virus, ya que en el primer caso la activación con FICZ no induce el desarrollo de células Th17 mientras que en el segundo favorece su diferenciación.<sup>117,124</sup>

Los estudios sobre AhR e infección sugieren que el resultado final de la interacción huésped-patógeno (capacidad de controlar al parásito, daño tisular, supervivencia, etc.) al activar AhR o suprimir su señalización depende en gran medida del modelo experimental utilizado, ya que la señalización de AhR interactúa con otras vías activadas durante la infección. Factores como el tipo de patógeno, forma de infección (localizada o sistémica), momento de activación de AhR (administración del/los ligando/s), características del ligando, entre otros, contribuirían a determinar el resultado final de la infección.<sup>150</sup>

## FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La Enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, está ampliamente distribuida en Centro y Sud América y representa un problema sanitario prioritario en nuestro país. Un tercio de las personas infectadas desarrollan, décadas después de la infección, Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC) mientras que los restantes dos tercios permanecen asintomáticos, a esta etapa de la enfermedad también se la conoce como indeterminada (IND).<sup>8</sup> Aún no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales ciertos individuos desarrollan CCC, sin embargo se ha establecido que estos pacientes presentan una respuesta inflamatoria de tipo Th1 de mayor intensidad que los IND.<sup>21</sup> Por otro lado, estudios realizados en diferentes cepas de ratones han demostrado que distintos individuos pueden presentar una mayor susceptibilidad a la infección o a la inmunopatología asociada a la infección con *T. cruzi*. Así, a pesar de ser más resistentes a la infección que los ratones Balb/c, los ratones B6 presentan una alta mortalidad debido a la toxicidad ocasionada por un desbalance entre mediadores pro- y anti-inflamatorios.<sup>22,159</sup> Por lo tanto, se podría postular que durante la infección con *T. cruzi* es necesario que el huésped establezca en una primera etapa una respuesta inflamatoria capaz de eliminar el parásito de manera rápida y efectiva, seguida de la activación de mecanismos regulatorios capaces de controlarla, limitando así el daño tisular causado por la excesiva reacción inflamatoria. Resulta entonces de suma importancia lograr un mejor entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares responsables de las distintas señales que promueven el desarrollo de una fuerte respuesta Th1, como así también de los que llevan a su posterior contracción.

La meta final de estos estudios es contribuir al entendimiento de los mecanismos involucrados en la regulación de la respuesta inmune regulatoria e inflamatoria que tienen lugar durante la infección parasitaria para así favorecer el desarrollo de nuevas y más eficaces estrategias terapéuticas que permitan mejorar la calidad de vida de los individuos que padecen esta enfermedad.

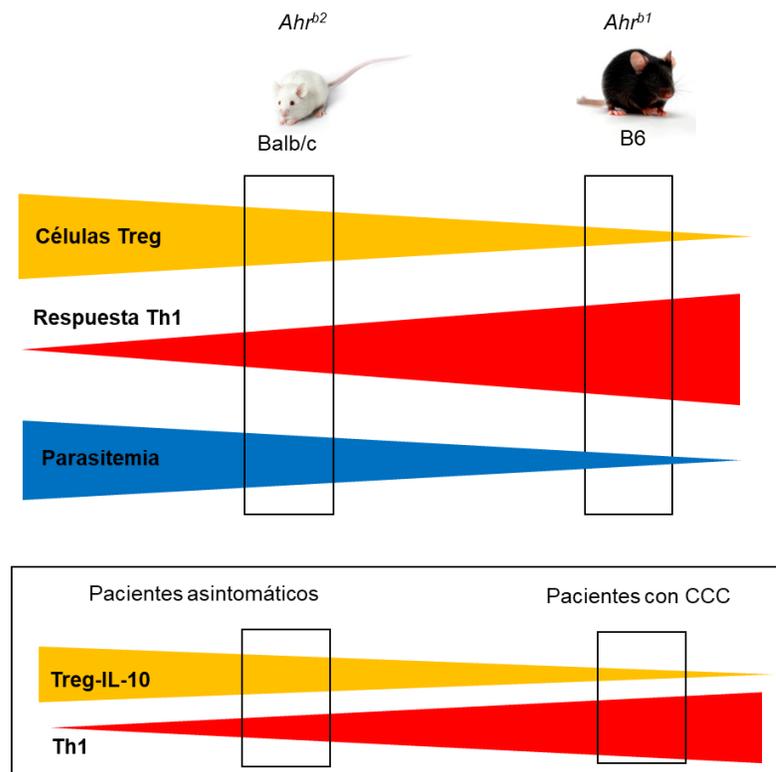


## CONSTRUCCIÓN DE LA HIPÓTESIS

Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo han demostrado que durante la infección con *Trypanosoma cruzi* la actividad de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) juega un rol fundamental en el control de la replicación parasitaria. Además, en estos estudio se identificó a 3-hidroxicinurenina (3-HK) como una de las moléculas responsables de la inhibición de la replicación de los amastigotes intracelulares y que además presenta efectos tóxicos directos sobre la forma sanguínea de *T. cruzi*. A su vez 3-HK es un metabolito generado en el catabolismo del triptófano (Trp) el cual se encuentra mediado por IDO en la vía de las kinureninas.<sup>41,160</sup>

A su vez, la administración de 3-HK en ratones Balb/c infectados es capaz de controlar la replicación del parásito y la patología inflamatoria mediante la regulación del perfil de respuesta inmune Th1 y Th2, y el desarrollo de células T regulatorias (Treg).<sup>161</sup> Distintos reportes indican que varios de los metabolitos de la vía de kinureninas, entre ellos L-kinurenina (KYN) y 3-HK son ligandos endógenos del receptor para aril hidrocarburos (AhR), un factor de transcripción dependiente de la unión a ligando conocido por mediar la acción tóxica de diferentes compuestos y que actualmente ha surgido como un importante regulador de la respuesta inmune por resultar un factor central en la diferenciación de distintas poblaciones de células T.<sup>68,92-94</sup> Así, se ha demostrado que la activación de AhR, dependiendo del ligando y del microambiente de citoquinas presente, favorece la diferenciación de las células T hacia un perfil de tipo regulatorio (Treg, Tr1) o inflamatorio (Th17).<sup>68,92-94</sup> Además, se ha observado que células dendríticas (CD) que no expresan AhR no son capaces de inducir la expresión de IDO, lo que lleva a una disminución en la cantidad de KYN producida por las CD y a una menor capacidad para generar células Treg en ensayos de cocultivo.<sup>135</sup> Por lo expuesto, AhR es necesario para la inducción de IDO, la cual a su vez genera metabolitos capaces de unirse a este receptor favoreciendo una respuesta regulatoria. Por otro lado, un importante aspecto del sistema AhR es la existencia de polimorfismos, los cuales influyen la capacidad de respuesta a ligandos.<sup>162,163</sup> Las cepas B6 y Balb/c presentan los alelos *Ahr*<sup>b1</sup> y *Ahr*<sup>b2</sup> respectivamente, clasificados como de alta respuesta por su capacidad de inducir la transcripción de *Cyp1a1*.<sup>162,163</sup> Los ratones B6 infectados presentan un mejor control de la replicación parasitaria que los Balb/c

pero generan una respuesta inflamatoria exacerbada que lleva a su muerte por falla hepática inflamatoria.<sup>159</sup> Esta cepa no expande la población de células Treg en paralelo a la gran expansión que sufre el compartimento de células T lo que resulta en una incrementada relación T convencionales/Treg.<sup>58</sup> Entonces, teniendo en cuenta que al igual que lo que sucede en los pacientes con CCC los ratones B6 presentan una respuesta inflamatoria exacerbada y no inducen células regulatorias (Figura 1), y considerando además que AhR es capaz de favorecer la diferenciación de células Treg y que durante la infección con *T. cruzi* se generan metabolitos de AhR, en este trabajo de tesis se plantea como hipótesis que durante la infección con *T. cruzi*, la señalización de AhR juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune inflamatoria característica de la enfermedad de Chagas.



**Respuesta inmune diferencial de los ratones B6 y Balb/c durante la infección con *T. cruzi*.** Los ratones B6 al igual que los pacientes con CCC son incapaces de controlar la respuesta inflamatoria y a diferencia de la cepa Balb/c no se incrementa la población de células regulatorias en relación a las células efectoras durante la infección

# OBJETIVOS



En este contexto, el objetivo general de este trabajo de tesis doctoral es estudiar la participación del Receptor para Aril Hidrocarburos en la regulación de la respuesta inmune durante la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*.

### **Objetivos específicos**

Objetivo I: Estudiar el efecto de la infección con *T. cruzi* en la modulación de la expresión de AhR en las cepas de ratones Balb/c y B6 y evaluar la relación entre los polimorfismos de AhR presentes en estas cepas y su respuesta a diferentes ligandos de AhR.

Objetivo II: Estudiar los efectos de la activación de AhR con ligandos exógenos y endógenos, generados durante la infección con *T. cruzi* en la regulación de la respuesta inmune protectora e inflamatoria.

Objetivo III: Estudiar la participación de AhR en la regulación de la respuesta inmune en el desarrollo de la memoria inmunológica durante la infección *T. cruzi*.

Objetivo IV: Evaluar los niveles plasmáticos de los metabolitos del eje Triptofano-IDO-AhR en individuos que cursan la etapa crónica de la infección con *T. cruzi*, su asociación con la presencia de cardiopatía y su posible utilización como biomarcadores.



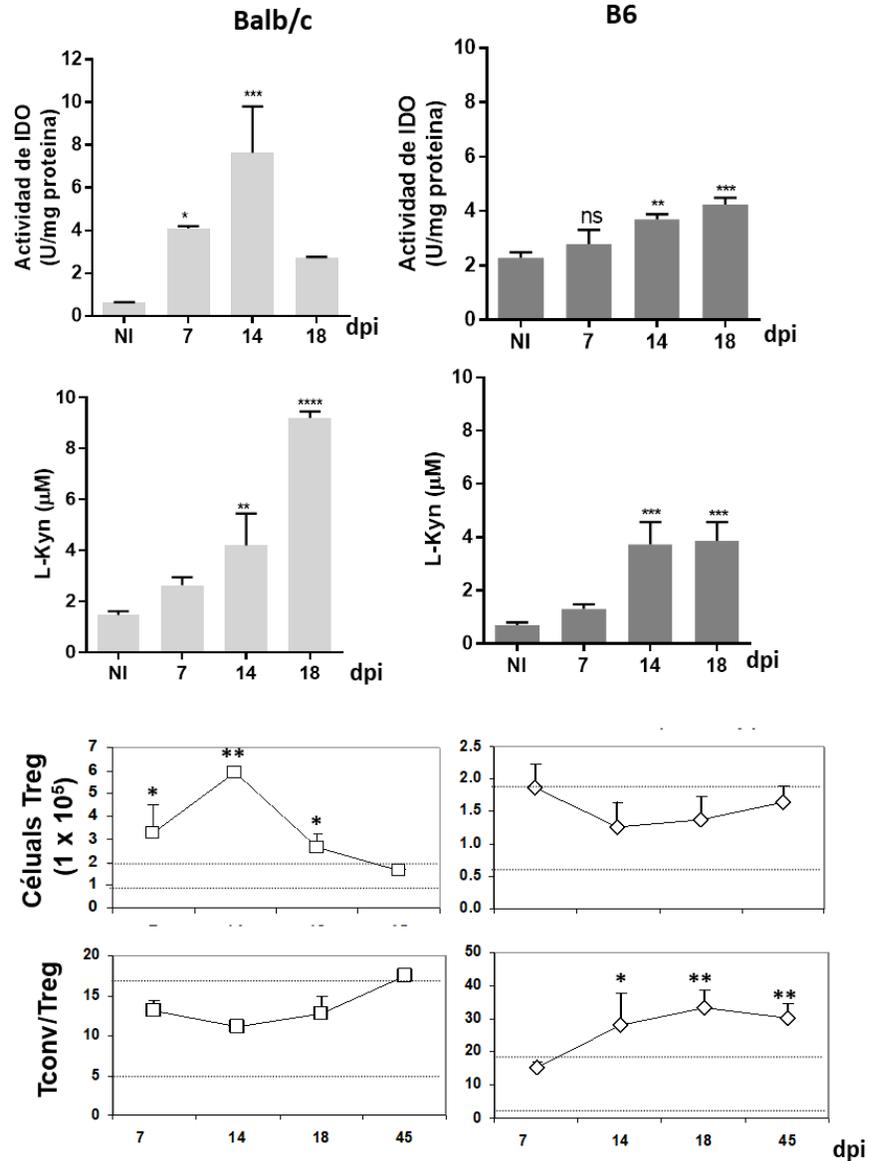
# RESULTADOS I



## ANTECEDENTES

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que la infección con *T. cruzi* induce la expresión y actividad de la enzimaIDO en distintos órganos de ratones Balb/c y B6 y en consecuencia se incrementa la concentración de KYN en suero.<sup>160</sup> Además, se ha observado que comparativamente la infección induce mayor actividad deIDO en esplenocitos de ratones Balb/c y consecuentemente estos ratones presentan mayores niveles de KYN en suero que los ratones B6. Sin embargo, estos últimos muestran un perfil inflamatorio más marcado caracterizado por una exacerbada respuesta de tipo Th1 (Figura A1A y B). Estos resultados podrían indicar que el mecanismo de control de la respuesta inflamatoria que involucra aIDO funcionaría de manera menos eficiente en los ratones B6. Además, los ratones Balb/c, a diferencia de lo reportado para los ratones B6, expanden la población de células Treg durante la infección con *T. cruzi* presentando una relación entre las poblaciones de células T convencionales (CD4+ CD25-) y Treg similar a la observada en los ratones no infectados (Figura A1C).

La activación de AhR induce en CD, independientemente de su estado de maduración, la transcripción de la enzimaIDO.<sup>92,164,165</sup> A su vez, la catabolización de Trp porIDO lleva a la producción de kinureninas, entre ellas KYN y 3-HK que pueden activar AhR y así generar un ciclo de retroalimentación positiva. Ciertamente, se ha reportado que KYN es capaz de inducir la diferenciación de células Treg de manera dependiente de AhR.<sup>92</sup> Considerando estos antecedentes se evaluó el efecto de la infección con *T. cruzi* sobre la expresión y actividad de AhR en estas cepas de ratones.



**Figura A1. Ratones B6 presentan menor actividad de IDO, menores niveles de KYN en suero y menor capacidad para inducir células Treg que los ratones Balb/c luego de la infección con *T. cruzi*.** Ratones Balb/c y B6 fueron infectados con 500 o 5000 tripomastigotes (Tps) de *T. cruzi*, respectivamente. El suero y los esplenocitos fueron obtenidos a diferentes tiempos post-infección (pi), mientras que ratones sin infectar (NI) fueron utilizados como control en cada punto pi. **A)** Actividad de IDO determinada en extractos de esplenocitos. **B)** Concentración de KYN en suero determinada por HPLC. **C)** Número absoluto de células Treg CD4+CD25+Foxp3+ en bazo (gráficos superiores) y relación entre células convencionales (CD4+CD25-Foxp3-) y células Treg (gráficos inferiores). Las líneas punteadas representan el promedio  $\pm$  DE de los valores obtenidos para los ratones NI. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  DE. Los valores de *p* se calcularon usando la prueba ANOVA de una vía, seguido del post test de comparación múltiple de Dunnet, se compararon los distintos tiempos pi contra el NI (*n*=3 en cada punto pi). Las diferencias significativas entre los grupos se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ , (\*\*)  $p \leq 0,01$ , (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ , (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ . (ns) no significativo).

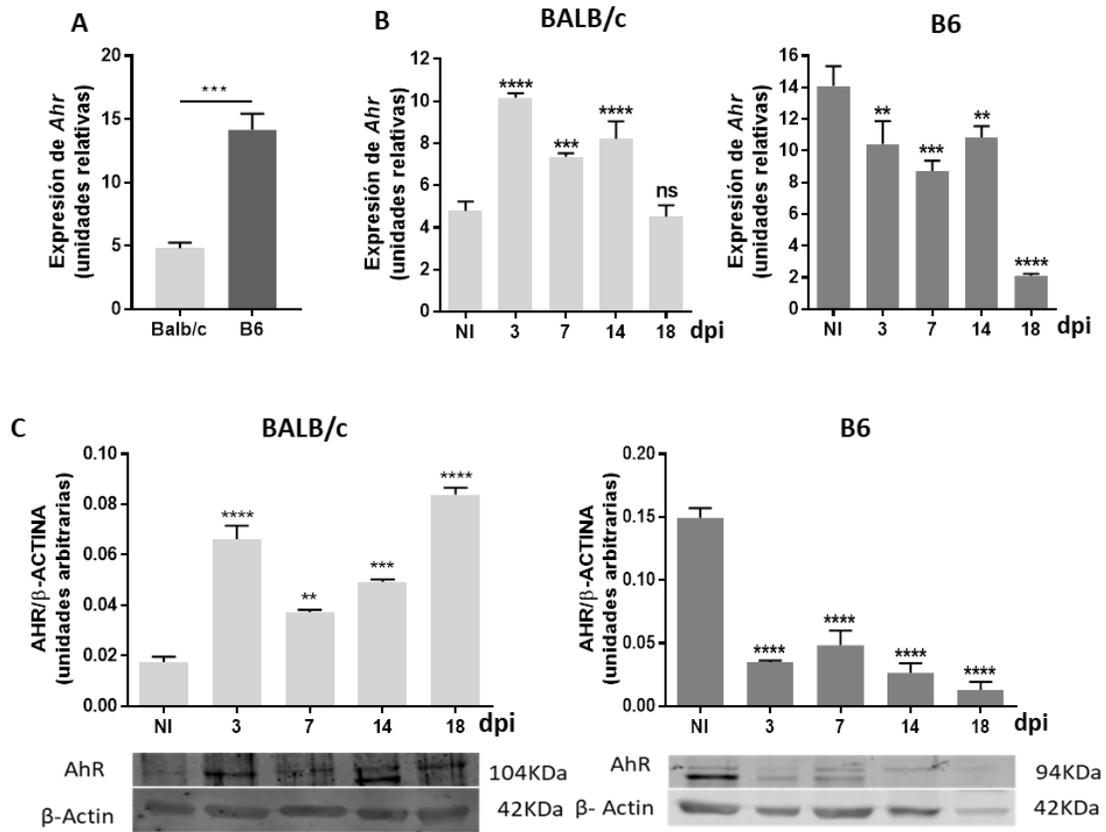
## **La infección con *Trypanosoma cruzi* modula la expresión de AhR en esplenocitos y el nivel de ligandos en suero de manera diferencial en ratones Balb/c y B6**

Ratones Balb/c y B6 fueron infectados con 50000 Tp de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen y se sacrificaron a distintos tiempos post infección (pi). Se evaluó la expresión de AhR en esplenocitos mediante qRT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa) y Western blot. Tal como se observa en la Figura 1A, en ausencia de infección, los esplenocitos de los ratones B6 expresan niveles significativamente mayores de ARNm que codifica para el receptor AhR que los Balb/c. Sin embargo, al transcurrir la infección la expresión de *Ahr* comienza a disminuir en B6, mientras que en los ratones Balb/c se produce un incremento en la transcripción de *Ahr* (Figura 1B). De manera similar a lo que ocurre con la expresión de *Ahr*, en los ratones Balb/c se observó un aumento en la expresión de la proteína AhR respecto al grupo NI, mientras que en células de bazo de ratones B6 su expresión disminuyó (Figura 1C). Estos resultados permiten concluir que la infección con *T. cruzi* modularía de manera diferencial la expresión de AhR, ARNm y proteína, en esplenocitos de ratones Balb/c y B6.

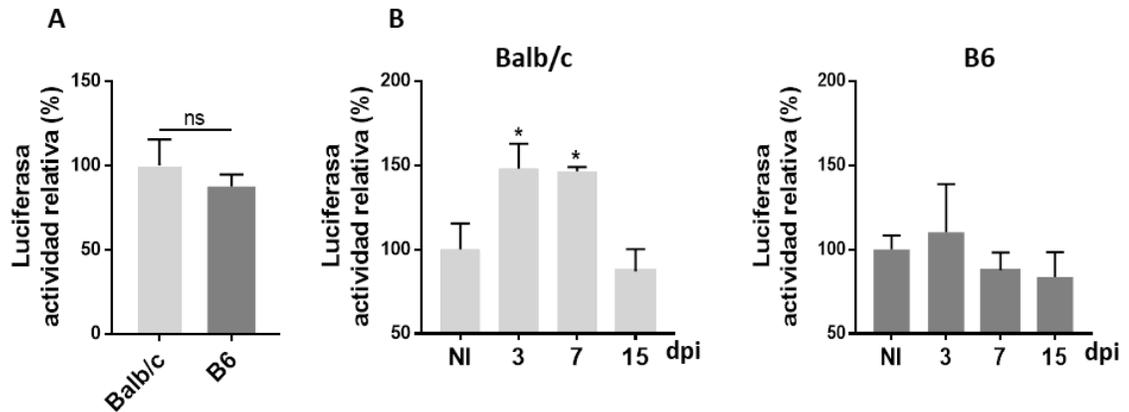
Además de KYN, se han reportado que otros productos endógenos derivados de la degradación del Trp son también ligandos de AhR. Por lo que es posible que durante la infección con *T. cruzi* además de los ligandos de AhR generados por la activación deIDO, otros ligandos provenientes de la dieta o del metabolismo del Trp por la microbiota, contribuyan en la activación de este receptor.<sup>68,92-94</sup> Con el objetivo de evaluar la modulación de los niveles de los de ligandos totales de AhR en suero de animales infectados en comparación con animales NI y entre las cepas de ratones, éstos se cuantificaron en suero de ratones B6 y Balb/c infectados y NI mediante un ensayo reportero descrito previamente por Rothhammer y col..<sup>166</sup> Brevemente, células de la línea murina 4T1, transfectadas con un plásmido que posee las secuencias DRE del promotor de *Cyp1a1* corriente arriba del gen de luciferasa, se cultivaron durante 24 hs con medio DMEM conteniendo 10% de suero de los diferentes ratones a los distintos tiempos pi. Los ligando presentes en los sueros se unen al AhR endógeno de las células

4T1 y este complejo se une a las secuencias DRE del plásmido activando la transcripción de luciferasa.

Ambas cepas de ratones presentaron niveles similares de agonistas de AhR en suero en ausencia de infección (Figura 2A). De manera interesante, los sueros de ratones Balb/c mostraron un incremento de la actividad de luciferasa en estadíos tempranos de la infección, mientras que no se observaron cambios en la actividad luciferasa respecto al Control en suero de ratones B6 durante la infección (Figura 2B). Por otro lado, se puede observar que el incremento sistémico de la actividad agonista AhR, que solo se observa en ratones Balb/c, ocurre en la fase muy temprana de la infección ya que en el día 15 pi los valores séricos en los animales infectados son similares a los de los NI. Estos resultados indican que a diferencia de los ratones B6, los ratones Balb/c incrementan en la fase aguda de la infección con *T. cruzi* los ligandos de AhR en forma sistémica.



**Figura 1.** La infección de *T. cruzi* modula de manera diferencial la expresión de AhR en esplenocitos de ratones Balb/c y B6. Esplenocitos de ratones infectados y no infectados (NI) fueron obtenidos a distintos tiempos post infección. Los niveles de expresión del ARNm que codifica para AhR (*Ahr*) se determinaron mediante qRT-PCR. Los niveles de expresión de la proteína AhR fue se determinaron mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico. **A)** Expresión de *Ahr* en esplenocitos de ratones Balb/c y B6 no infectados. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  DE de la expresión relativa de *Ahr* normalizada respecto a la expresión de  $\beta$ -actina (n=3 en cada punto pi). La significancia se calculó utilizando la prueba *t* de Student. **B)** Expresión de *Ahr* en esplenocitos de ratones Balb/c (izquierda) y B6 (derecha) NI e infectados a distintos tiempos pi. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  DE de la expresión relativa de *Ahr* normalizada respecto a la expresión de  $\beta$ -actina (n=3 en cada punto pi). La significancia se calculó utilizando ANOVA de una vía, seguido del post test de comparación múltiple de Dunnet para comparar los distintos tiempos pi en relación al NI. **C)** Western blot representativo de la expresión de AHR en esplenocitos de ratones de cada cepa NI e infectados a distintos tiempos post infección. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  DE de la expresión de AHR relativizada a la expresión de  $\beta$ -ACTINA (n=3 en cada punto pi). La significancia se calculó utilizando ANOVA de una vía, seguido del post test de comparación múltiple de Dunnet, para comparar los distintos tiempos pi en relación al NI. (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ; (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$



**Figura 2.** Durante la fase aguda de la infección experimental con *T. cruzi* se incrementan en forma sistémica los niveles de ligandos de AhR en suero de los ratones Balb/c. Células de la línea celular murina 4T1 transfectadas de manera transitoria con un plásmido que contiene una secuencia DRE perteneciente al promotor de *Cyp1a1* corriente arriba del gen de luciferasa se en medio DMEM conteniendo 10% de sueros de ratones B6 y Balb/c NI e infectados con *T. cruzi* a diferentes tiempos pi. **A)** Actividad luciferasa detectada en sueros de ratones B6 y Balb/c NI. Se consideró como 100% la actividad luciferasa del promedio de las lecturas que arrojaron los sueros de ratones Balb/c. **B)** Actividad luciferasa detectada en sueros de ratones Balb/c y B6 a distintos tiempos pi. Se consideró como 100% de actividad luciferasa al promedio de las lecturas que arrojaron los sueros de los ratones Balb/c o B6 NI, respectivamente. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  DE. La significancia se calculó utilizando ANOVA de una vía, seguido del post test de comparación múltiple de Dunnet; se compararon los valores obtenidos a los diferentes tiempos pi con los obtenidos en NI. Se utilizaron 4 ratones por punto y cada determinación se realizó por triplicado. Las diferencias significativas entre los grupos se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ ; (ns= no significativo).

## Los ratones Balb/c y B6 responden de manera diferente a ligandos débiles de AhR

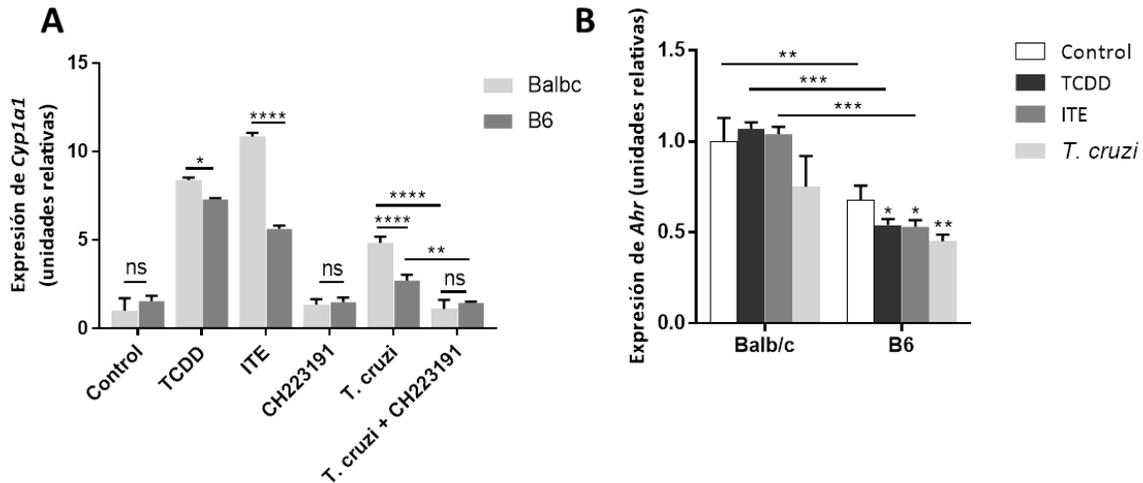
Las Figuras 1 y 2 muestran que a diferencia de los ratones Balb/c, los ratones B6 no regularon positivamente la expresión de AhR ni incrementaron los niveles de ligandos de este receptor en la fase aguda de la infección con *T. cruzi*. Estos dos datos claves podrían tener una asociación con la deficiente regulación de la respuesta inmune inflamatoria observada en ratones B6 luego de la infección con este protozoario. Otro factor a tener en cuenta sería el efecto del polimorfismo en AhR sobre la respuesta a los ligandos, ya que se ha reportado que variaciones en un solo nucleótido en porciones específicas de la secuencia de este receptor llevan a una menor respuesta al ligando TCDD.<sup>163</sup> En este sentido, las cepas B6 y Balb/c expresan los alelos *Ahr*<sup>b1</sup> y *Ahr*<sup>b2</sup>, respectivamente, definidos como altamente respondedores a TCDD, mientras que otras cepas de ratones como la DBA/2J o los ratones NOD expresan el alelo *Ahr*<sup>d</sup> de baja afinidad<sup>163</sup>. Sin embargo, los alelos *Ahr*<sup>b1</sup> y *Ahr*<sup>b2</sup> presentan diferencias estructurales, entre ellas el receptor de la cepa Balb/c es de mayor tamaño debido a que el codón de terminación de traducción TGA se encuentra mutado, extendiendo el marco abierto de lectura.<sup>163</sup> Así, los polimorfismos de AhR presentes en las cepas de ratones estudiadas podrían diferenciarse en la respuesta a ligandos diferentes de TCDD como los que se producen durante la infección con *T. cruzi*.

Con el objetivo de determinar el nivel de respuesta de los receptores polimórficos presentes en las cepas Balb/c y B6 frente a ligandos se obtuvieron macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) de ratones Balb/c y B6. Posteriormente se los incubó con los ligandos TCDD, ITE y con lisado total de *T. cruzi* durante 24 h luego de las cuales se determinó la expresión de *Ahr* y la expresión de *Cyp1a1* como medida de la capacidad de estos ligandos para activar al receptor. Los MDMO de ratones Balb/c mostraron mayor expresión de *Cyp1a1* que los de ratones B6 tanto cuando se los estimuló con TCDD como con ITE (Figura 3A). La estimulación con TCDD indujo un aumento de aproximadamente 8 veces en la expresión de *Cyp1a1* respecto al Control en los MDMO de ratones Balb/c, mientras que esta relación fue de alrededor de 5 veces en MDMO de ratones B6. Sin embargo, la mayor diferencia en la expresión de *Cyp1a1* se observó al comparar la respuesta de las células de las diferentes cepas de ratones frente al ligando endógeno ITE. Los MDMO de ratones Balb/c incrementaron 11 veces la expresión de *Cyp1a1*

luego del estímulo con ITE mientras que los MDMO de los ratones B6 solo lo hicieron 4 veces (Figura 3A). Teniendo en cuenta reportes que indican que ciertos factores de virulencia bacterianos pueden actuar como ligandos de AhR,<sup>153</sup> se estimularon MDMO con lisado de Tp de *T. cruzi* a los fines de evaluar si productos del parásito pueden activar a AhR. La Figura 3A muestra que el lisado de *T. cruzi* fue capaz de inducir la expresión de *Cyp1a1* en las células de ambas cepas de ratones, y que este efecto puede ser bloqueado en presencia del antagonista específico CH223191. Nuevamente, los MDMO de ratones Balb/c mostraron mayor incremento de expresión de *Cyp1a1* luego del estímulo que las células de los ratones B6 (5 vs 1,65 veces).

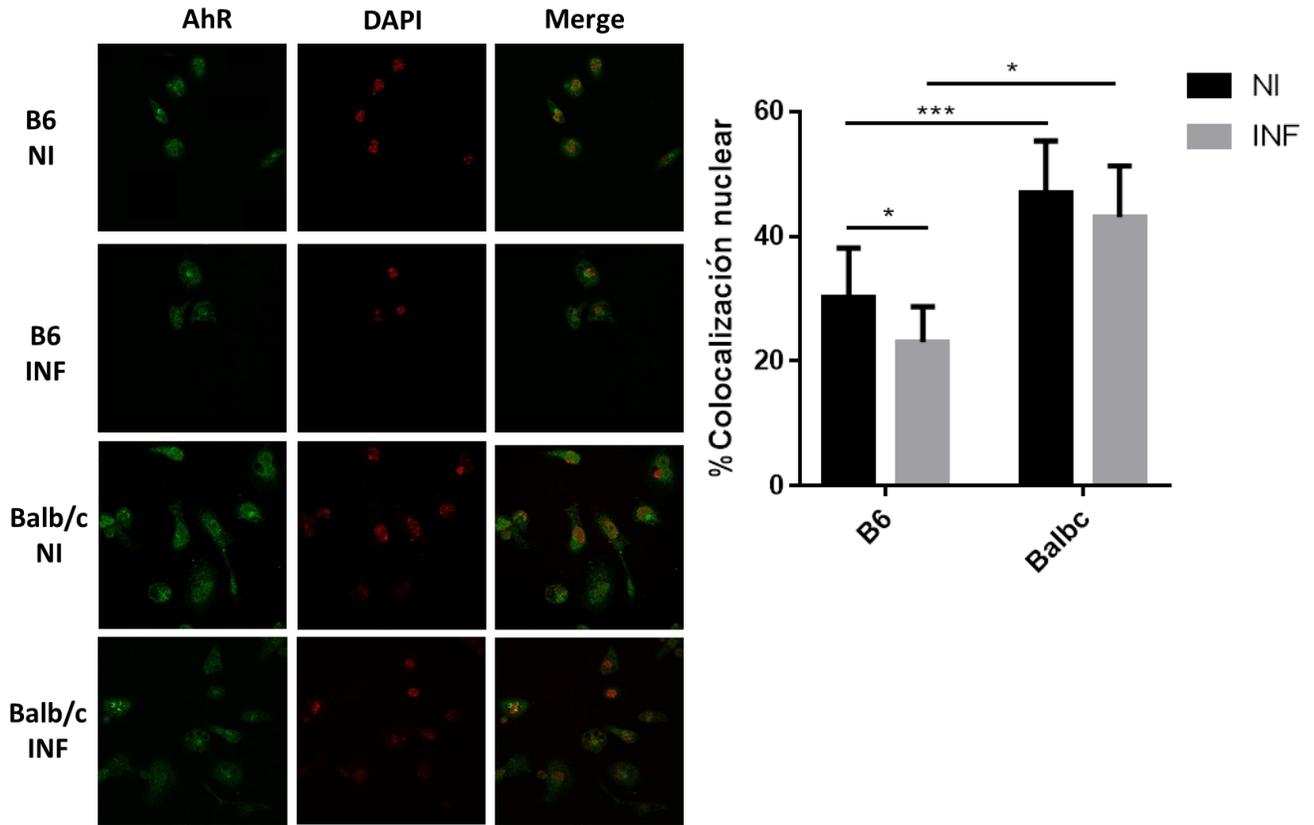
El análisis de la expresión de *Ahr* en los MDMO mostró que a diferencia de lo que observado en esplenocitos, los MDMO NI de ratones B6 NI muestran menor expresión de *Ahr* que los de Balb/c (Figura 3B). De manera interesante, y al igual que lo observado en esplenocitos (Figura 1C), la estimulación de MDMO de ratones B6 con ligandos de AhR o lisado de *T. cruzi*, disminuyó la expresión de *Ahr* (Figura 3B). Además, se observó que los MDMO de ratones Balb/c no modifican la expresión de *Ahr* luego de la estimulación con los diferentes ligandos (Figura 3B).

Dado que variaciones en la secuencia de aminoácidos entre polimorfismos pueden afectar procesos post traduccionales y considerando que la movilización de AhR del citoplasma al núcleo puede ser inhibida por la fosforilación de sitios específicos en la secuencia de importación nuclear (NLS),<sup>167</sup> se analizó mediante inmunofluorescencia el porcentaje de colocalización de AhR en el núcleo de macrófagos obtenidos de peritoneo (MP) de ratones B6 y Balb/c infectados luego de 24 h de infección.



**Figura 3. MDMO de ratones Balb/c y B6 muestran diferente respuesta frente a ligandos de AhR.** MDMO de ratones Balb/c y B6 fueron estimulados por 24 h con TCDD, ITE, CH223191, lisado total de *T. cruzi* y lisado en combinación con el antagonista CH223191. **A)** Expresión de *Cyp1a1* determinada mediante qRT-PCR. La significancia fue calculada con la prueba *t* de Student. **B)** Expresión de *Ahr* determinada mediante qRT-PCR. La significancia se calculó en cada cepa de ratón con ANOVA de una vía seguido por el post test de comparación múltiple de Dunnett, respecto al Control de cada cepa. Los valores de *p* entre distintas cepas se calcularon usando la prueba *t* de Student. Los resultados se muestran como el promedio de los triplicados  $\pm$  DE de la expresión relativa de los genes *Cyp1a1* y *Ahr* normalizada respecto a la expresión de *Actina*. Las diferencias significativas entre los grupos se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ; (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ . (ns= no significativo).

En todas las condiciones, se observó una mayor colocación nuclear de AhR en MP de ratones Balb/c que en MP de ratones B6. Además, en concordancia con la modulación de la expresión de *Ahr* (Figura 3B), el nivel de colocación nuclear de AhR en MP de ratones B6 disminuye luego del estímulo inducido por la infección, mientras que en los MP de ratones Balb/c los niveles de AhR en el núcleo se mantienen (Figura 4).



**Figura 4.** Los ratones B6 muestran un menor porcentaje de colocalización de AhR en el núcleo de MP luego de 24 h de infección. Se muestra un campo representativo de cada grupo (1200X) (izquierda). Cuantificación de Inmunofluorescencia determinando el porcentaje de AhR que colocaliza en el núcleo con el marcador fluorescente DAPI en MP obtenidos de ratones B6 y Balb/c NI e infectados a las 24 h pi. Los niveles de expresión de AhR (% del área total) y el coeficiente de colocalización de Mander s (% nuclear) fueron calculados utilizando FIJI/ImageJ. Verde: AhR, Rojo: Núcleos. La barras muestran el promedio  $\pm$  DE de los % de colocalización obtenidos analizando 30 fotografías por grupo. Los valores de  $p$  se calcularon usando la prueba t de Student. Las diferencias significativas entre los grupos se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

## CONCLUSIONES I

La infección con *T. cruzi* modula de manera diferencial la expresión de AhR en los ratones Balb/c y B6. Luego de la infección se incrementa o disminuye la expresión de este receptor en células de bazo de ratones Balb/c y B6, respectivamente.

Macrófagos peritoneales de ratones Balb/c y B6 infectados muestran activación diferencial de AhR: luego de la infección se observa menor translocación al núcleo de AhR en macrófagos de peritoneo de ratones B6 que en los de ratones Balb/c.

El alelo *Ahr*<sup>b1</sup> presente en los ratones B6 es menos respondedor a ligandos que el *Ahr*<sup>b2</sup> expresado por los ratones Balb/c.

La infección aguda con *T. cruzi* induce un incremento significativo de ligandos sistémicos de AhR en ratones Balb/c.

Estos resultados en su conjunto sugieren que en los ratones B6 tanto los mecanismos que regulan la expresión de AhR y su traslocación al núcleo luego de la infección, como así también la presencia de un polimorfismo menos respondedor a ligandos débiles, producidos durante la infección, estarían asociados a la baja producción sistémica de ligandos endógenos y podrían tener consecuencias importantes en la inducción de mecanismos que controlan las respuestas inflamatorias (expresión deIDO, inducción de células Treg, etc).



## RESULTADOS II



## **Infección experimental con *T. cruzi*: Efecto de la activación de AhR *in vivo* sobre la modulación de la respuesta inmune.**

Debido a su capacidad de modular la respuesta inmune tanto innata como adaptativa se ha comenzado a considerar a AhR como un blanco potencial para el tratamiento de desórdenes inflamatorios. En este sentido, se ha reportado que la administración de TCDD en modelos murinos de autoinmunidad tales como EAE, enfermedad de Crohn, diabetes tipo 1 y uveitis autoinmune experimental, es capaz de mejorar los síntomas clínicos y la inmunopatología asociada mediante mecanismos que incluyen la modulación del balance entre células Treg y Th17 y la disminución de secreción de citoquinas inflamatorias.<sup>117,128,168</sup>

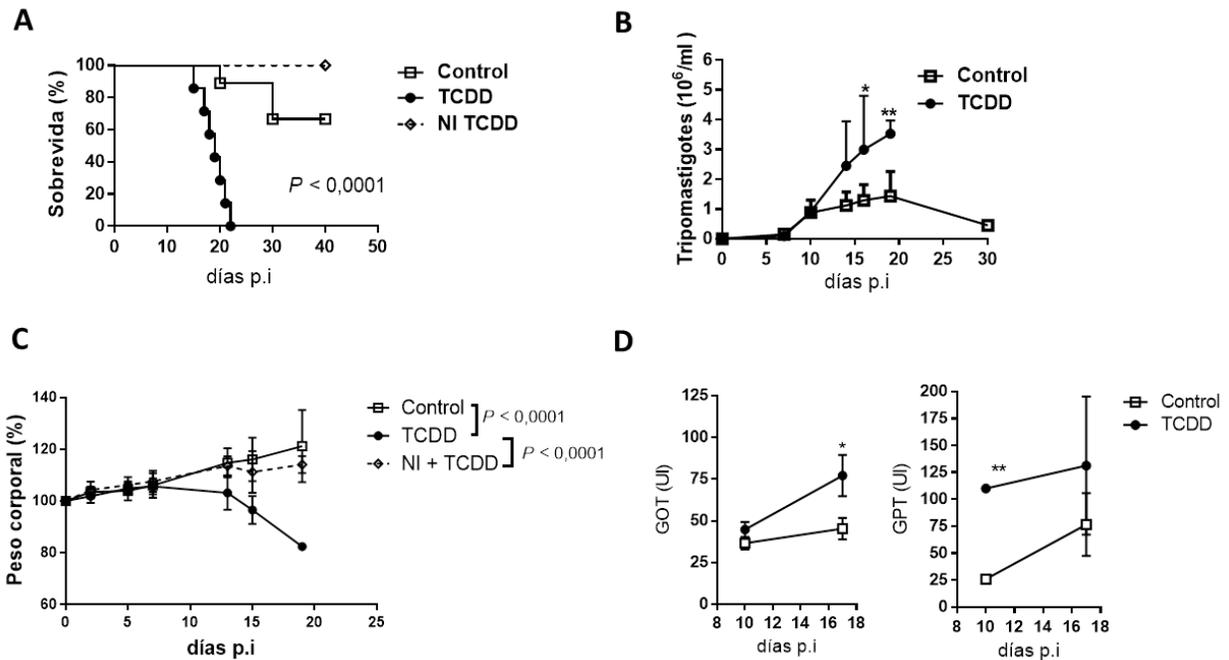
Teniendo en cuenta reportes previos sobre el potencial uso de ligandos de AhR como estrategia terapéutica para inducir una respuesta de células Treg, y que durante la infección con *T. cruzi* los ratones B6 desarrollan una respuesta inflamatoria exacerbada de tipo Th1, ya que no son capaces de montar una respuesta regulatoria adecuada y que los mecanismos asociados con la generación de ligandos de AhR podrían estar afectados en esta cepa de ratones, se procedió a estudiar si la administración *in vivo* de ligandos de AhR es capaz de modular la respuesta inmune generada durante la infección con *T. cruzi* y así evitar la inmunopatología.

## **La activación de AhR mediante el ligando exógeno TCDD disminuye la resistencia del huésped a la infección experimental con *Trypanosoma cruzi***

Con la finalidad de estudiar el efecto de la activación de AhR en la modulación de la respuesta inmune en el contexto de la infección con *T. cruzi*, se inyectaron ratones B6 hembras de 8-10 semanas por vía intraperitoneal (ip) con TCDD (40ug/Kg)<sup>117</sup> o vehículo (DMSO) en el caso del grupo Control. Luego de 24hs los ratones fueron infectados por vía ip con 50000 Tps de la cepa Tulahuen. Ratones no infectados y tratados con TCDD fueron evaluados a los fines de determinar efecto tóxico de TCDD en los tiempos estudiados (NI TCDD).

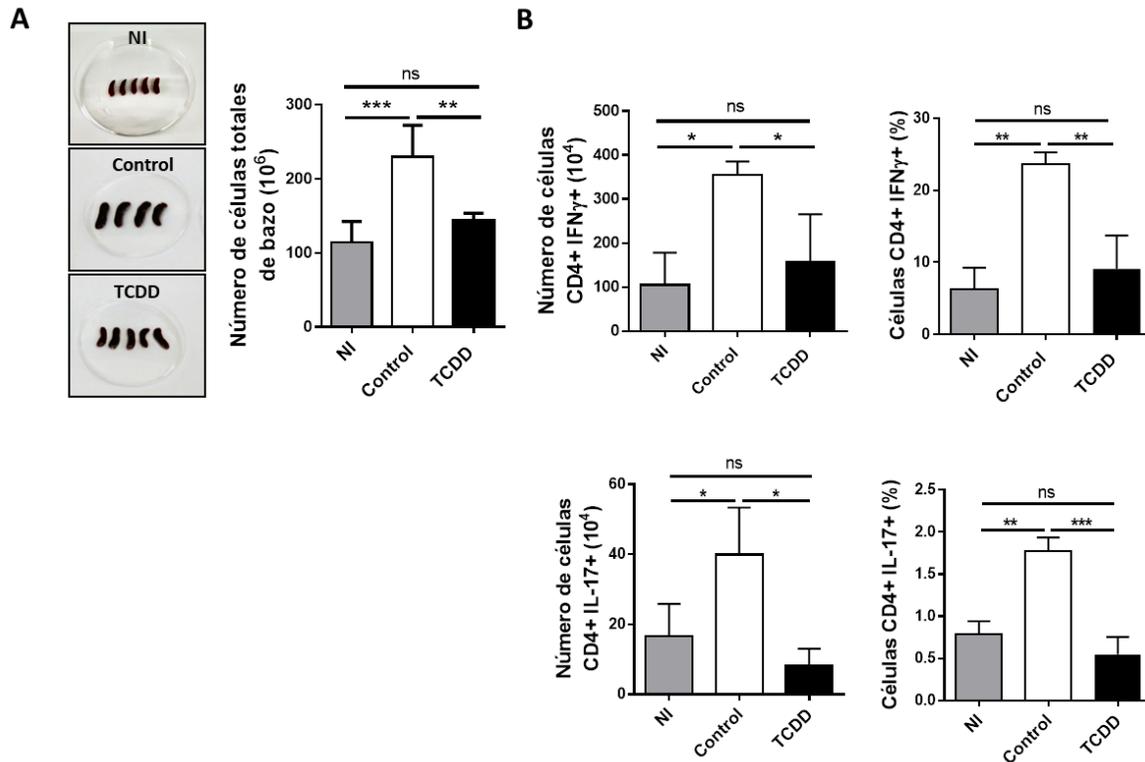
Los ratones tratados con TCDD presentaron significativamente mayor parasitemia y menor sobrevida, observándose la mortalidad del 100% de los ratones infectados tratados alrededor del día 22 pi. Además, se evidenció una disminución progresiva del peso corporal en los días pi cercanos al pico de la parasitemia (13-19 pi) y un aumento en la concentración de las transaminasas hepáticas: glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato-piruvato transaminasa (GPT) en relación con el grupo Control (Figura 5). Cabe destacar que la sobrevida de los ratones no infectados tratados con TCDD no resultó afectada, siendo la sobrevida del 100%, lo que indicaría que la dosis de TCDD administrada, en ausencia de la infección, no tendría un efecto letal sobre los ratones.

Posteriormente se procedió a evaluar las consecuencias de la activación de AhR mediada por TCDD sobre la composición del compartimiento de células T en bazo de los ratones infectados y controles. A tal fin y teniendo en cuenta la sobrevida observada, los animales se sacrificaron al día 10 pi, durante la etapa aguda de la infección.



**Figura 5. El tratamiento con TCDD disminuye la resistencia del hospedador a la infección.** Ratones B6 fueron inyectados por vía ip con TCDD (40ug/Kg) o DMSO (Control) 24hs antes de la infección con 50000 Tps de la cepa Tulahuen de *T. cruzi*. **A)** Porcentaje de sobrevivencia de ratones NI TCDD, TCDD y Control. La significancia se calculó utilizando la prueba de Gehan-Breslow-Wilcoxon. NI TCDD, n=5; TCDD, n=7; Control, n=9. **B)** Parasitemia determinada a diferentes días pi. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  DE de los valores obtenidos en los diferentes grupos: TCDD, n=5; Control, n=7. **C)** Porcentaje de peso corporal, considerando como 100% el promedio del peso de los ratones de cada grupo en el tiempo 0. La significancia se calculó utilizando ANOVA de dos vías seguido del post test de comparación múltiple de Tukey. **D)** Nivel de enzimas hepáticas GOT y GPT en suero de ratones infectados al día 10 y 17 pi. La significancia se calculó utilizando la prueba *t* de Student para cada punto al día 10 y 17 pi. Las diferencias significativas entre los grupos se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,00001$ . (ns = no significativo)

Los bazos de los animales del grupo tratado con TCDD mostraron una marcada reducción de tamaño y celularidad respecto al grupo Control, en los cuales se evidenció la esplenomegalia característica de la enfermedad (Figura 6A). Los esplenocitos se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar el porcentaje y número absoluto de células CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  y CD4<sup>+</sup> productoras de IL-17. En la Figura 6B se observa que tanto el porcentaje como el número absoluto de estas poblaciones se encuentran disminuidos en el grupo tratado, con valores similares a los observados en el bazo de los ratones NI.



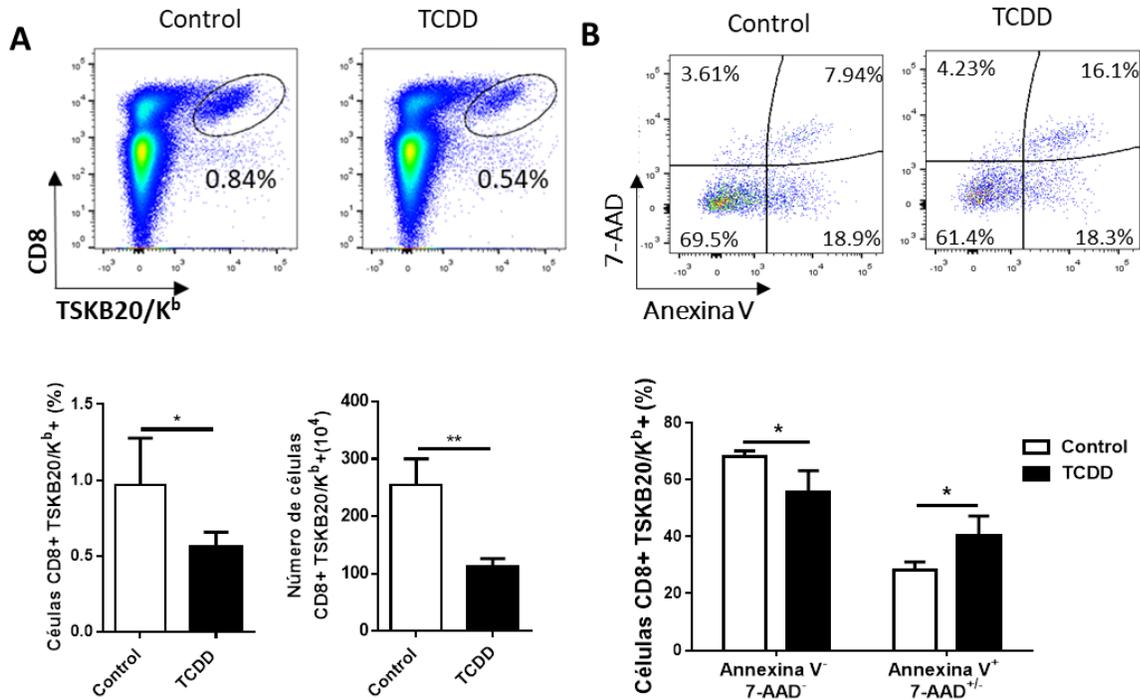
**Figura 6.** El tratamiento con TCDD administrado previo a la infección con *T. cruzi* evita el incremento del tamaño del bazo y la inducción de poblaciones de células T CD4+ esplénicas productoras de IL-17 e IFN- $\gamma$ . Al día 10 pi se extrajo el bazo de los ratones NI, Control y TCDD y se analizaron distintas poblaciones celulares mediante citometría de flujo. **A)** Imágenes de la apariencia y el tamaño relativos de los bazos de los animales de los diferentes grupos al día 10 pi. Se muestra un experimento representativo de tres realizados (izquierda). Número de células totales de bazo de ratones NI, TCDD y Control al día 10 pi. **B)** Porcentaje y número absoluto de células CD4+ productoras de IFN- $\gamma$  y CD4+ IL-17+ en bazo al día 10 pi. Los esplenocitos fueron incubados durante 4 horas con un estímulo policlonal (PMA/Ionomicina), brefeldina A y monensina y luego teñidos con Ac anti-CD4, anti-IFN- $\gamma$  y anti-IL-17 unidos a distintos fluorocromos y analizadas mediante citometría de flujo. Los resultados (A-B) se muestran como el promedio de los porcentajes obtenidos  $\pm$  DE. La significancia se calculó usando ANOVA de una vía seguido por el post test de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias significativas entre los grupos se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ . (ns= no significativo).

Por otro lado, debido a la importancia de la población de células T CD8+ en el Control parasitario durante esta infección, se caracterizó la respuesta T CD8+ específica contra el parásito en este modelo experimental de activación de AhR con un ligando de alta afinidad administrado un día antes de la infección. Para ello se tuvo en cuenta que en este contexto la respuesta CD8+ se encuentra en gran medida dirigida hacia un grupo acotado de péptidos codificados por genes de la familia de las transalidasas (TcTS).<sup>169</sup> Así, se evaluó por citometría de flujo la población de células T CD8+ específicas contra el péptido inmunodominante de la TcTS<sup>169</sup> utilizando un tetrámero marcado con fluorocromo que está compuesto por 4 moléculas

del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH-I) (del haplotipo H-2Kb expresado por la cepa de ratón B6) en el que cada una de ellas se encuentra unida el péptido TSKB20 (ANYKFTLV). Como puede observarse en la Figura 7A, Los animales tratados con TCDD mostraron, al día 10 pi, menor frecuencia de linfocitos T CD8+ específicos para el antígeno TSKB20 (población a la que se referirá de aquí en adelante como linfocitos T CD8+ específicos) en comparación a los ratones Control.

En vista de que varios trabajos han reportado que la activación de AhR mediante TCDD favorece la apoptosis de células T activadas tanto *in vitro* como *in vivo*,<sup>170,171</sup> se procedió a determinar si la disminución observada en esta población de linfocitos T CD8+ específicos podría deberse a este fenómeno. Para ello, se determinó el porcentaje y número absoluto de células T CD8+ específicas viables y apoptóticas mediante citometría de flujo utilizando el colorante vital 7-amino-actinomicina (7-AAD), la proteína de unión a fosfolípidos Anexina-V en combinación con anticuerpo anti-CD8+ y el tetrámero marcados con diferentes fluorocromos.

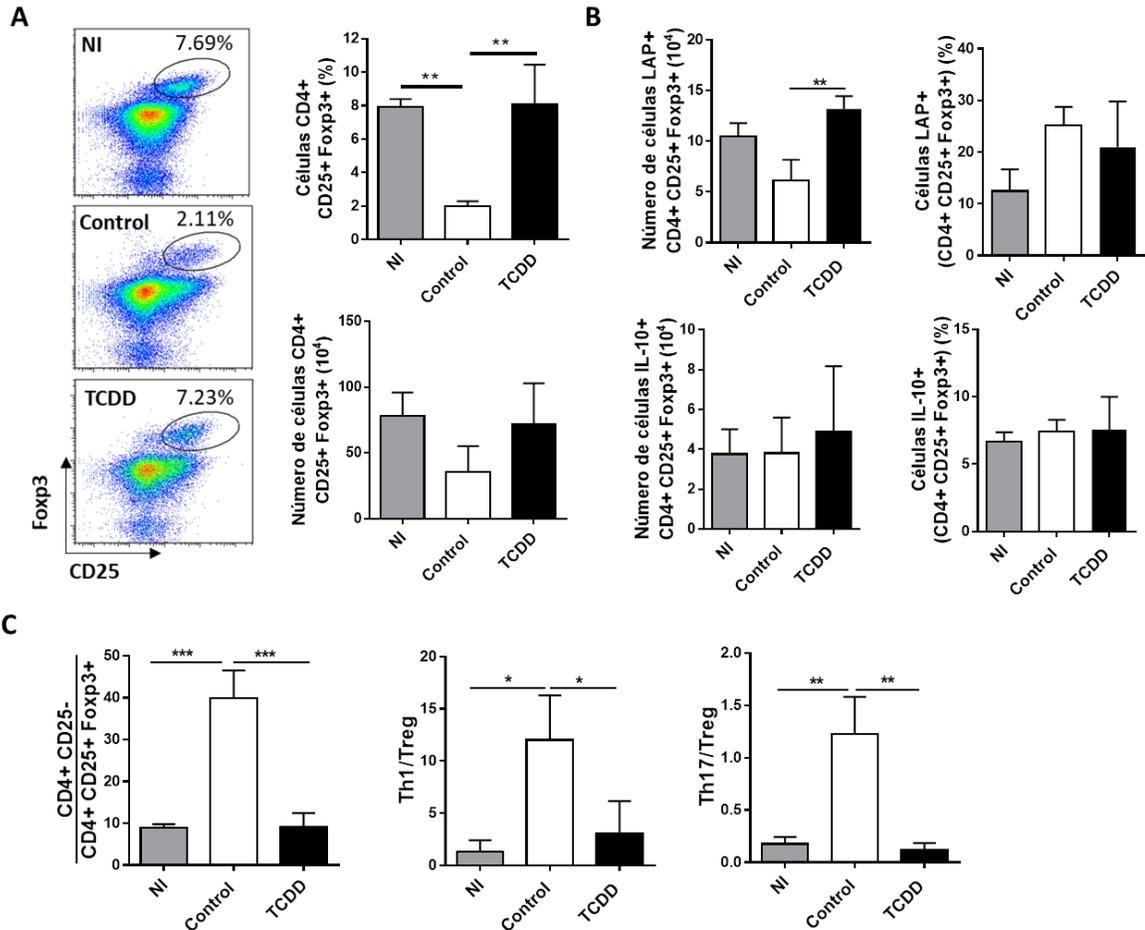
Durante los procesos de muerte celular se generan cambios morfológicos en las células entre los que se encuentran la pérdida de integridad de la membrana celular, que se evidencia mediante el ingreso de 7-AAD a la célula. Por otro lado, durante el proceso de apoptosis la enzima flipasa deja de actuar y el fosfolípido fosfatidilserina (PS) que se encuentra en la cara interna de la membrana celular transloca hacia la membrana externa, evento que puede detectarse mediante Anexina-V ya que esta proteína posee alta afinidad de unión a la PS, dando cuenta del proceso de apoptosis. Entonces, en consonancia con los reportes mencionados, el grupo de ratones tratados con TCDD presentó un menor porcentaje de células vivas (Anexina-V-7-AAD-) y un mayor porcentaje de células T CD8+ específicas apoptóticas, es decir, que son Anexina-V positivas y se tiñen o no con 7-AAD (Anexina-V+ 7-AAD+/-) que el grupo Control (Figura 7B), lo cual podría contribuir a la disminución de esta población observada en la Figura 7A.



**Figura 7.** El tratamiento con TCDD administrado previo a la infección con *T. cruzi* induce la disminución de la población de células T CD8+ específicas contra el parásito, incrementando su apoptosis. Células de bazo de los ratones TCDD y Control fueron obtenidas al día 10 pi. **A)** Gráficos de puntos representativos (panel superior) y de barras representando el porcentaje y número absoluto de células CD8+ TSKB20/Kb+ en bazo (panel inferior). **B)** Gráficos de puntos representativos mostrando el porcentaje de células CD8+ TSKB20/Kb+ que expresan Annexina-V y 7-AAD (panel superior) y gráficos de barra representando el porcentaje de células CD8+ TSKB20/Kb+ Annexina-V- 7-AAD- (viables) y Annexina V+ 7-AAD+/- en bazo (apoptóticas). Control, n=4; TCDD, n=5. Las barras representan el promedio  $\pm$  DE. La significancia se calculó mediante la prueba *t* de Student. Las diferencias significativas entre los grupos Control y TCDD se indican como (\*)  $p \leq 0,05$  y (\*\*)  $p \leq 0,01$ .

Los efectos del tratamiento con TCDD sobre la inducción de células Treg (CD4+ CD25+ Foxp3+) y la producción de citoquinas inmunoregulatorias se muestra en la Figura 8. No se observaron diferencias significativas en el número de células Treg esplénicas entre los grupos analizados. Sin embargo, el porcentaje de células Treg se encontró significativamente aumentado en los ratones tratados con TCDD respecto al grupo Control (Figura 8A). Al analizar por citometría de flujo la producción de las citoquinas inmunoregulatorias TGF- $\beta$  e IL-10 por las células Treg, se observó un incremento en el número de células Treg productoras de TGF- $\beta$  (LAP+) en el grupo TCDD respecto al grupo Control, mientras que no se observaron diferencias significativas entre los grupos en el porcentaje de Treg capaces de producir TGF- $\beta$ , ni en el número y porcentaje de células Treg productoras de IL-10 (Figura 8B). Además, los ratones

tratados con TCDD mostraron, respecto al grupo Control, una disminución significativa en la relación entre el número total de células CD4+ CD25- (T convencionales), Th1 (CD4+ IFN $\gamma$ +) y Th17 (CD4+ IL-17+), y el número de células Treg (Figura 8C). Esta relación alcanzó niveles similares a los del grupo NI, sugiriendo una normalización de este parámetro.



**Figure 8. El tratamiento con TCDD normaliza el balance entre la respuesta inflamatoria y la respuesta regulatoria T CD4+.** Células de bazo de ratones NI, Control y TCDD fueron obtenidas al día 10 pi. **A)** Gráficos de puntos representativos (derecha) y de barras (izquierda) mostrando el porcentaje y número absoluto de células CD4+ que expresan CD25 y Fop3 al día 10 pi. **B)** Número absoluto y porcentaje de células Treg productoras de TGF- $\beta$  (LAP+) e IL-10, luego de 4 horas de estimulación con PMA/Ionomicina, brefeldina y monensina. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  DE, n=3 animales por grupo **C)** Relación entre células T convencionales (CD4+CD25-), Th1 (CD4+Fop3-IFN- $\gamma$ +) y Th17 (CD4+IL-17+) y las células Treg (CD4+CD25+Fop3+). Las barras representan el promedio de cada relación  $\pm$  DE, n=3 animales por grupo. La significancia se calculó usando ANOVA de una vía seguido por el post test de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias significativas se indican como (\*) p $\leq$ 0,05, (\*\*) p $\leq$ 0,01, (\*\*\*) p $\leq$ 0,001.

El hecho de que el tratamiento con TCDD induzca la muerte de las células T específicas contra el parásito (activadas) y que normalice la relación entre células T convencionales y Treg, sugiere que las células Treg podrían ser menos sensibles a la muerte inducida por TCDD. A los fines de evaluar esta hipótesis, se estudió la presencia de apoptosis en las células Treg mediante la tinción con Anexina-V y 7-AAD. La identificación de las células Treg con el marcador Foxp3 intracelular requiere de un paso de fijación que es incompatible con la utilización del colorante 7-AAD para identificar integridad de membrana. Por este motivo, se identificó a la población Treg utilizando los marcadores CD4+ y FR4 (receptor de folato 4), debido a que se ha reportado que el fenotipo de las células CD4+ FR4+ concuerda con el de las células Treg.<sup>172</sup> El análisis de la expresión de Anexina-V y 7-AAD en la población CD4+ FR4+ no mostró diferencias significativas entre los grupos TCDD y Control (Figura 9), lo que sugiere que las células Treg son más resistentes a la apoptosis mediada por TCDD que las células T convencionales.

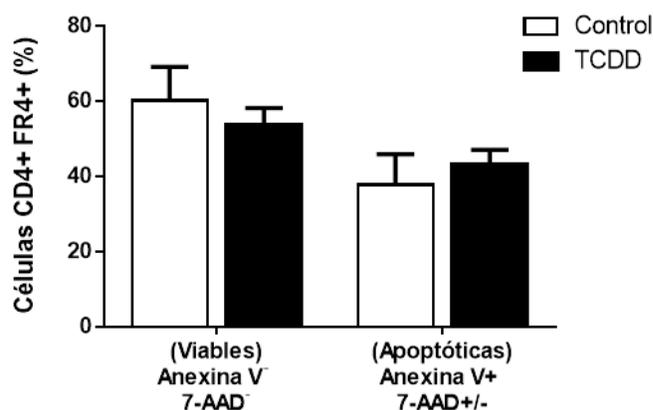
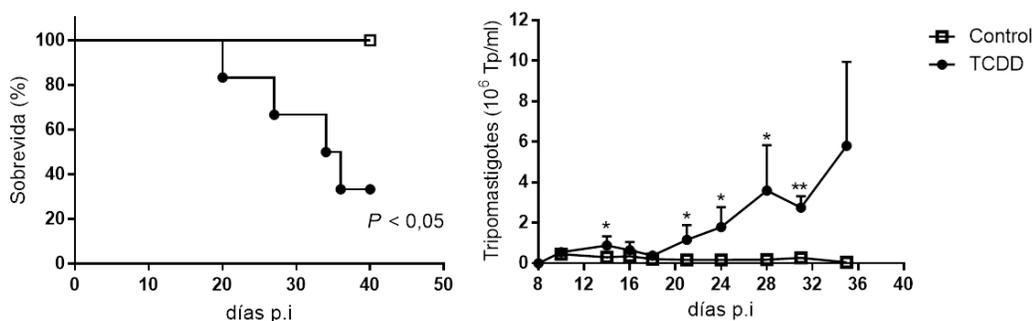


Figura 9. Las células Treg (CD4+ FR4+) son resistentes a la apoptosis mediada por TCDD. Porcentaje de células CD4+FR4+ Annexina-V<sup>-</sup> 7-AAD<sup>-</sup> y Anexina V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+/-</sup> en bazo. Los resultados presentados como gráficos de barra representan el promedio  $\pm$  DE, Control, n=4; TCDD=5.

Los resultados obtenidos con la administración de TCDD antes de la infección, muestran que a pesar de favorecer la regulación de la respuesta inflamatoria en los ratones B6 infectados con *T. cruzi*, la activación de AhR durante la etapa de inducción de la respuesta inmune, con un ligando de alta afinidad y muy difícil de metabolizar, no permite el óptimo desarrollo de la respuesta específica encargada de la eliminación del parásito. Teniendo esto en consideración, se modificó el esquema experimental administrando TCDD en ratones B6 infectados al día 7 pi, considerando un tiempo sin tratamiento para la correcta inducción de la respuesta específica. En comparación con el esquema experimental anterior, la administración de TCDD una semana

luego de la infección prolongó la sobrevida de los ratones tratados, 87% vs 0% de sobrevida al día 22 pi (Figura 10A y 5A). Además, se observó un retraso en el incremento de la parasitemia, en este sentido al 28 pi (Figura 10B) se observó una parasitemia similar a la registrada al día 19 (Figura 5B) del esquema anterior. Sin embargo, el grupo tratado con TCDD mostró valores de parasitemia significativamente mayores que los del grupo Control y un menor porcentaje de sobrevida, por lo que este esquema, al igual que el anterior, disminuye la resistencia a la infección.

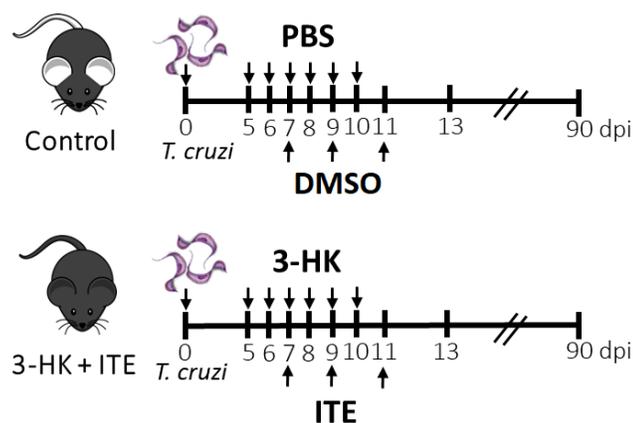


**Figura 10. Efecto de la administración de TCDD al día 7 pi sobre la parasitemia y sobrevida de ratones B6 infectados.** Los ratones B6 fueron infectados con 50000 Tps de la cepa Tulahuen de *T. cruzi* y al día 7 pi se los trató con TCDD (40ug/Kg) por vía ip. **A)** Porcentaje de sobrevida de ratones TCDD y Control. La significancia se calculó utilizando el prueba de Gehan-Breslow-Wilcoxon. TCDD, n=6; Control, n=6. **B)** Parasitemia (Tps/ml de sangre). Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  DE, n=6 animales por grupo. La significancia se calculó usando la prueba *t* de Student. Las diferencias significativas entre los grupos Control y TCDD se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ , (\*\*)  $p \leq 0,01$ .

## La administración combinada de 3HK e ITE promueve la diferenciación de células Treg y tiene efectos perjudiciales sobre la inmunidad parásito específica

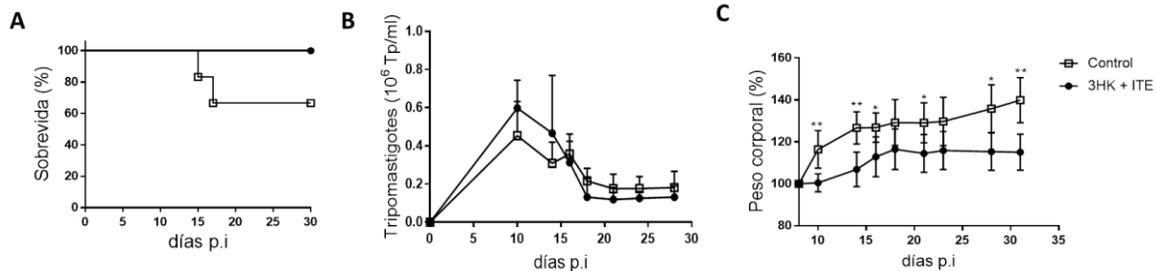
Además de TCDD se han reportado otros ligandos capaces de favorecer la diferenciación de células Treg y que, a diferencia de TCDD, no presentan efectos tóxicos, debido probablemente a su menor tiempo de metabolización. Uno de estos es el compuesto denominado ITE, originalmente aislado de pulmón de cerdo, y cuya afinidad por AhR es comparable a la de compuestos como TCDD y FICZ, característica que lo convierten en una valiosa herramienta para el estudio de la modulación de la respuesta inmune. Por otro lado, nuestro grupo ha reportado que el metabolito 3-HK posee un efecto tóxico directo sobre los estadios de amastigote y tripomastigote de *T. cruzi*, siendo además este compuesto un ligando de AhR.<sup>92</sup> Teniendo en cuenta las características de estos compuestos se desarrolló un esquema de administración de ITE y 3-HK con el objetivo de activar AhR favoreciendo el desarrollo de una respuesta regulatoria y simultáneamente inhibir la replicación del parásito.

El esquema consistió en la inyección por vía ip de seis dosis de 3-HK (20uM) desde el día 5 al 10 pi, y tres dosis de ITE (200ug) administradas en los días 7, 9 y 11 pi. El grupo Control fue inyectado con PBS del día 5-10 pi y con DMSO en los días 7, 9 y 11 pi (Figura 11).



**Figura 11. Esquema de administración de 3-HK + ITE.** Los ratones tratados fueron inyectados con 3-HK por vía ip desde el día 5-10 pi y con ITE en los días 7, 9 y 11 pi. El grupo Control recibió PBS y DMSO en los días 5 al 10 y en los días 7, 9 y 11, respectivamente

A diferencia de lo observado cuando se activó AhR con TCDD, no se observaron diferencias significativas en la sobrevida y parasitemia entre el grupo tratado con 3-HK + ITE y Control (Figura 12A y B). Sin embargo, se observó una disminución significativa en el peso corporal de los ratones tratados en relación al grupo Control (Figura 12C).

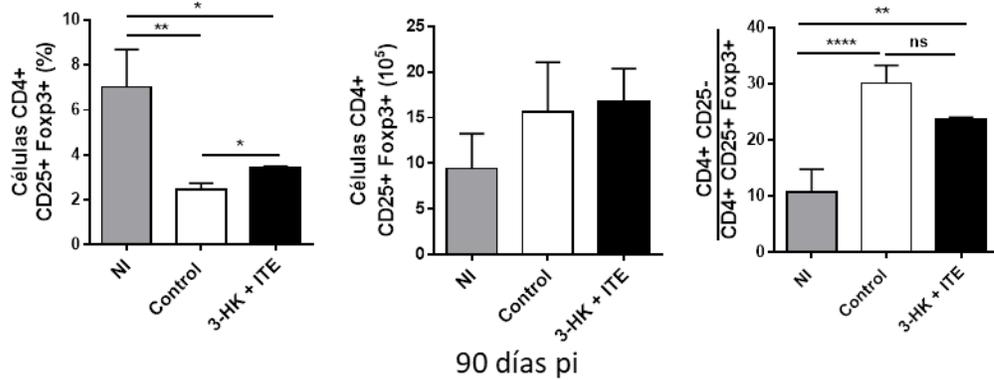


**Figura 12. Efecto del tratamiento con 3HK + ITE sobre la parasitemia, peso corporal y sobrevida de ratones B6 infectados.** Ratones B6 fueron infectados con 50000 Tps de la cepa Tulahuen de *T. cruzi* y luego tratados con 3-HK + ITE o PBS + DMSO en el caso del grupo Control. **A)** Porcentaje de sobrevida. La significancia estadística se calculó utilizando la prueba de Gehan-Breslow-Wilcoxon. **B)** Parasitemia (Tps/ml de sangre). Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  DE, n=4 animales por grupo. **C)** Porcentaje de peso corporal, considerando como 100% el promedio del peso de los ratones de cada grupo en el tiempo 0. La significancia estadística se calculó usando la prueba *t* de Student para comparar cada día pi. Las diferencias significativas entre los grupos se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ .

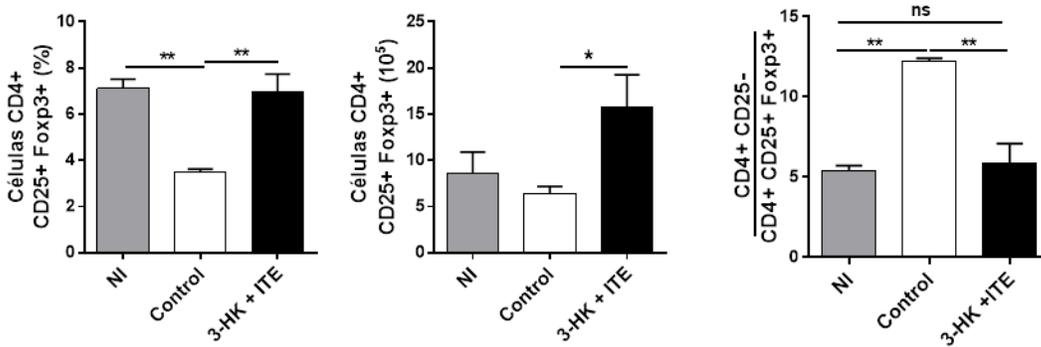
Teniendo en consideración que el tratamiento con 3-HK es capaz de modular la respuesta inmune y la carga parasitaria en los ratones Balb/c infectados con *T. cruzi*,<sup>160,161</sup> se analizó la respuesta celular mediante citometría de flujo y el parasitismo celular en órganos blanco mediante qPCR. Para ello, los ratones fueron sacrificados en la etapa aguda (días 13 y 22 pi) y crónica de la infección (día 90 pi). No se observaron diferencias significativas en el número de células totales de bazo entre los grupos de ratones infectados; sin embargo, se evidenció un aumento significativo en el porcentaje (días 13 y 90 pi) y número absoluto (día 90 pi) de células Treg esplénicas en los ratones del grupo tratado respecto al Control (Figura 13). Además, el tratamiento con 3-HK + ITE normalizó en la etapa crónica la relación entre células T CD4+ convencionales y Treg a valores similares a los observados en el grupo Control.

Al analizar la producción de TGF- $\beta$  (LAP+) por las células Treg se observó un aumento en el porcentaje (día 13 pi) y en el número absoluto (día 90 pi) de esta población celular en bazo de los ratones tratados respecto del grupo Control (Figura 14).

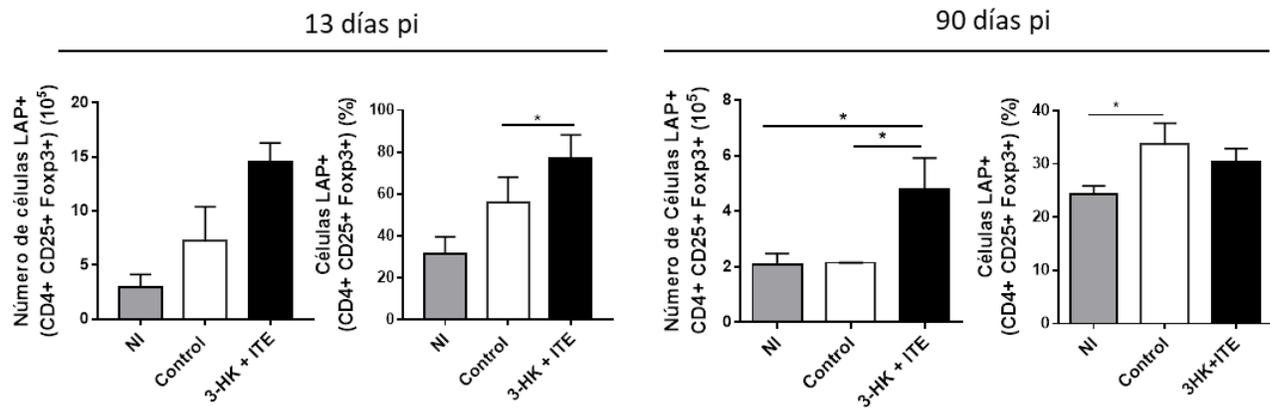
13 días pi



90 días pi

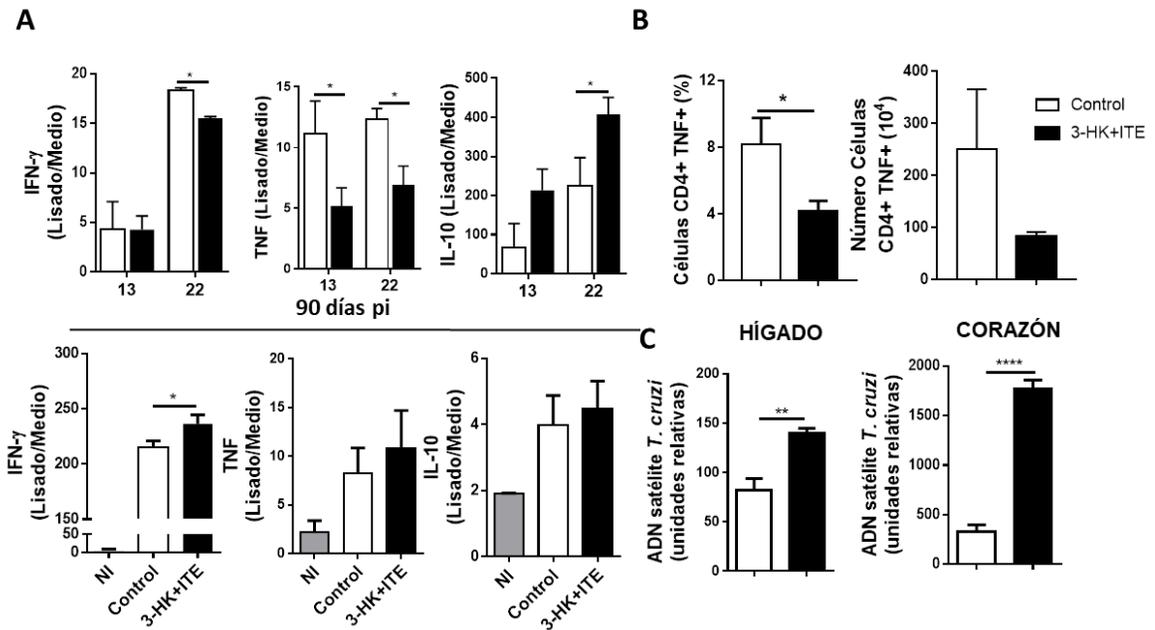


**Figura 13. La administración de 3-HK + ITE promueve la diferenciación de células Treg.** Porcentaje y número absoluto de células Treg (CD4+CD25+Foxp3+) y relación entre células convencionales (CD4+ CD25-) y células Treg (CD4+ CD25+ Foxp3+) en los distintos grupos experimentales al día 13 y 90 pi. Día 13 pi: Control n=3; 3-HK + ITE: n=4. Día 90 pi: Control, n=3; 3-HK +ITE, n=3. La significancia estadística se calculó utilizando ANOVA de una vía seguido por el post test de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias significativas entre los grupos Control y TCDD se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ , (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*\*) y  $p \leq 0,0001$  (ns=no significativo). Se muestra un experimento representativo de tres realizados en similares condiciones.



**Figura 14. La administración de 3-HK + ITE aumenta la población de células Treg productoras de TGF- $\beta$ .** Porcentaje y número absoluto de células Treg (CD4+CD25+Foxp3+) LAP+ en bazo de los distintos grupos experimentales en los días 13 y 90 pi luego de 4 horas de estimulación con PMA/Ionomicina. Los resultados se muestran como el promedio de los valores obtenidos  $\pm$  DE. La significancia estadística que calculó usando ANOVA de una vía seguido por el post test de comparación múltiple de Tukey. Día 13 pi: Control n=3; 3-HK + ITE: n=4. Día 90 pi: Control, n=3; 3-HK +ITE, n=3. Las diferencias significativas entre los grupos Control y TCDD se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ . Se muestra un experimento representativo de tres realizados en similares condiciones.

Con objetivo de evaluar la respuesta antígeno específica, se analizó la producción de citoquinas por esplenocitos obtenidos de los diferentes grupos a distintos tiempos pi estimulados durante 72 h en presencia de antígeno total de *T. cruzi* o medio de cultivo completo como Control. Se analizó mediante ELISA en sobrenadante de cultivo la concentración de citoquinas en condiciones de estimulación antigénica y se normalizaron los valores encontrados en relación a la concentración de citoquinas detectada en cultivos sin estimular. Las células de ratones que fueron tratados con 3-HK + ITE analizadas en la fase aguda de la infección (día 22 pi) secretaron luego del estímulo con antígenos de *T. cruzi* mayores niveles de IL-10 y menores de TNF e IFN- $\gamma$  que las del grupo Control (Figura 15A). En concordancia con estos hallazgos, en la etapa aguda de la infección los ratones tratados presentaron menores porcentajes de células CD4+ productoras de TNF (Figura 15B). En la etapa crónica de la infección (90 pi), los esplenocitos de ratones tratados mostraron un ligero incremento en la producción de IFN- $\gamma$  respecto de los obtenidos del grupo Control cuando fueron estimulados con antígenos del *T. cruzi* (Figura 15A).



**Figura 15.** El tratamiento con 3HK + ITE durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi* afecta el desarrollo de la respuesta inmune protectora. **A)** Citoquinas en sobrenadante de cultivo de esplenocitos (días 13, 22 y 90 pi) cultivados en presencia de medio cultivo completo o lisado total de *T. cruzi* durante 72 h. Los resultados se expresan como la relación entre la concentración de citoquinas detectadas en los cultivos estimulados con lisado y la concentración de citoquinas detectadas en sobrenadante de células sin estimular. **B)** Porcentaje y número absoluto de células CD4+ TNF+ en bazo en día 22 pi luego de 4 h de estimulación con PMA/Iono en presencia de brefeldina y monensina. **C)** Carga parasitaria en hígado y corazón determinadas en el día 90 pi. (n=4 para cada grupo). Se normalizó la expresión de ADN parasitario a la GAPDH murina. La significancia estadística se calculó utilizando la prueba *t* de Student. Las diferencias significativas entre los grupos Control y 3-HK + ITE se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*\*) y  $p \leq 0,0001$ . Se muestra un experimento representativo de tres realizados en similares condiciones.

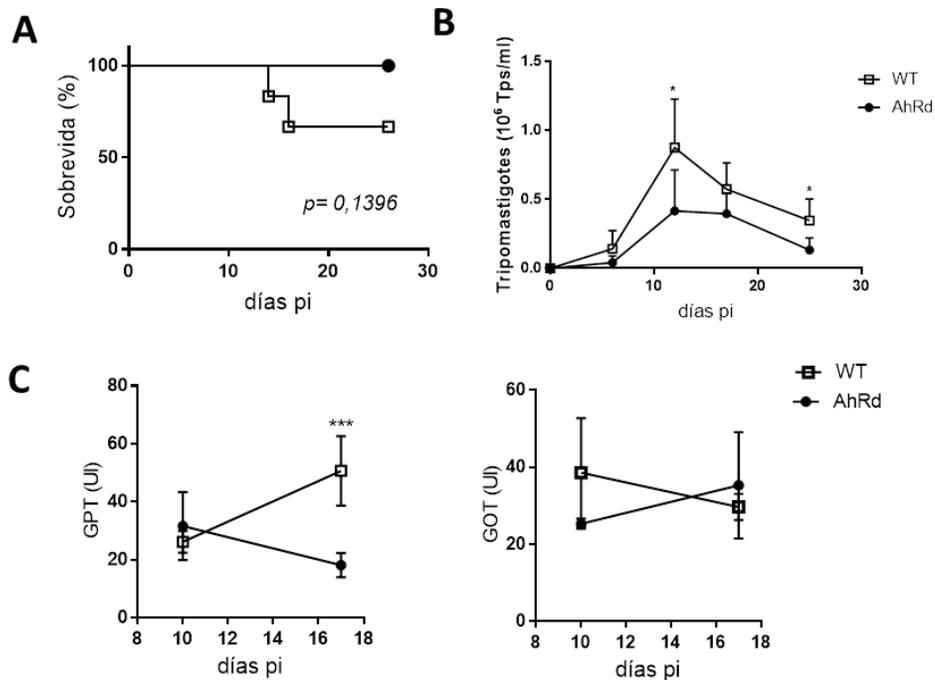
Por último y con el objetivo de determinar si la respuesta regulatoria generada compromete a la respuesta inmune protectora, se analizó la carga parasitaria por qPCR en hígado y el corazón, tejidos por los cuales el parásito tiene tropismo. Para ello se utilizó el sistema de sondas Taqman que reconocen secuencias específicas del ADN satélite de *T. cruzi*.<sup>173</sup> Al comparar los niveles de expresión del ADN satélite, se observó que el grupo de ratones tratados presentó tanto en hígado como en corazón mayor carga parasitaria (Figura 15C). Este incremento en la carga parasitaria podría explicar el aumento en la producción de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de cultivo estimulado con antígeno total de *T. cruzi* al día 90 pi (Figura 15A).

Los resultados obtenidos mediante la implementación de este modelo experimental sugieren que la administración de 3-HK + ITE podría ser considerada como una nueva forma de tratamiento capaz de controlar la respuesta inflamatoria. Sin embargo, considerando nuestros resultados y un reporte reciente de Araujo y col., la expansión de células Treg durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi* podría condicionar la aparición de la respuesta inmune protectora parásito específica, influyendo de manera crítica en la resistencia del hospedador frente a la infección.<sup>57</sup>

## **La señalización de AhR participa en el desarrollo la respuesta Th1 y mecanismos inmunoregulatorios generados durante la infección con *T. cruzi***

Con la finalidad de profundizar en el estudio del rol de la activación de AhR sobre la respuesta inmune generada durante la infección con *T. cruzi* se utilizaron ratones B6 congénicos que son genéticamente idénticos a los B6 pero expresan la variante alélica AhR<sup>d</sup> caracterizada como de baja afinidad de unión a ligando,<sup>163</sup> a los cuales se denominará AhR<sup>d</sup> de ahora en adelante. El alelo AhR<sup>d</sup> presenta 10 veces menos afinidad por el ligando TCDD el alelo AhR<sup>b-1</sup> presente en los ratones B6, lo que indica que se necesitaría una concentración de ligando 10 veces mayor para producir similares efecto.<sup>163</sup> Utilizando estos ratones resultó posible estudiar la activación del receptor mediada por ligandos endógenos generados en el transcurso de la infección con *T. cruzi*, como los provenientes de la degradación del Trp, sin necesidad de recurrir a ratones AhR KO ya que estos presentan múltiples anormalidades fisiológicas, entre ellas alteraciones en el sistema inmune y el desarrollo de órganos como el hígado.<sup>110,174</sup>

Ratones AhR<sup>d</sup> y B6 (de ahora en adelante denominados WT) fueron infectados con 50000 Tps de la cepa Tulahuen de *T. cruzi* y se estudió la parasitemia, sobrevida y los niveles de enzimas hepáticas durante la fase aguda de la infección. Los ratones AhR<sup>d</sup> mostraron una sobrevida del 100% al día 30 pi mientras que la de los ratones WT fue de alrededor del 65% (Figura 16A). En relación a estos resultados, los ratones AhR<sup>d</sup> presentaron niveles de parasitemia significativamente más bajos que los WT durante el pico de la infección (Figura 16B), así como también menores niveles de la transaminasa hepática GPT en suero (Figura 16C).



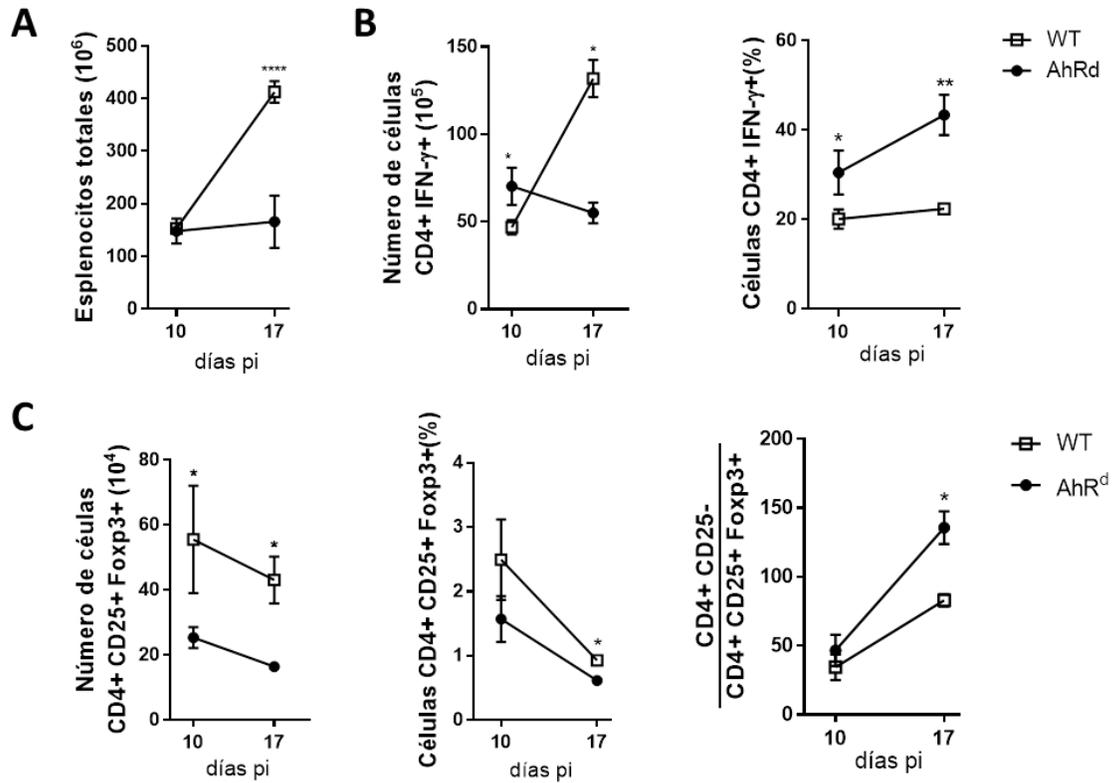
**Figura 16. Ratones AhRd presentan mayor resistencia a la infección con *T. cruzi*.** Ratones AhRd y WT fueron infectados con 50000 Tps de la cepa Tulahuen de *T. cruzi*. **A)** Porcentaje de sobrevivencia. La significancia estadística se calculó utilizando la prueba de Gehan-Breslow-Wilcoxon. WT, n=6; AhRd, n=6. **B)** Parasitemia (Tps por ml de sangre) WT, n=6; AhRd, n=6. **C)** Concentración de las transaminasas GOT y GPT en suero de ratones infectados en los días 10 y 17 pi. Día 10 pi: WT y AhRd n=3; día 17 pi: WT, n=4; AhRd n=3. Los resultados se muestran como el promedio de los valores obtenidos  $\pm$  DE. La significancia estadística se calculó utilizando la prueba t de Student comparando entre grupos a un mismo tiempo de infección. Las diferencias significativas entre los grupos WT y AhRd se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$  y (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

A los fines de evaluar el rol de la señalización AhR por ligandos fisiológicos producidos durante la infección en el desarrollo de la respuesta inmune, en primer lugar, se evaluó el número de células totales de bazo. Al día 10 pi ambos grupos de ratones presentaban valores de celularidad similares. Sin embargo, al día 17 pi, luego del pico de parasitemia, el bazo de los ratones WT triplica su celularidad mientras que en los ratones AhRd el número se mantiene en valores similares a los hallados al día 10 pi (Figura 17A). Se observó además que el porcentaje de células CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  fue mayor en los ratones AhRd que en los WT, tanto en el día 10 como 17 pi (Figura 17B). De manera interesante, si se tiene en cuenta que diferentes reportes asocian una mayor respuesta Th1 con daño hepático, los ratones AhRd que muestran enzimas hepáticas en valores normales, presentaron mayor número de células CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  al día 10 pi que los ratones WT. Sin embargo, es importante destacar que

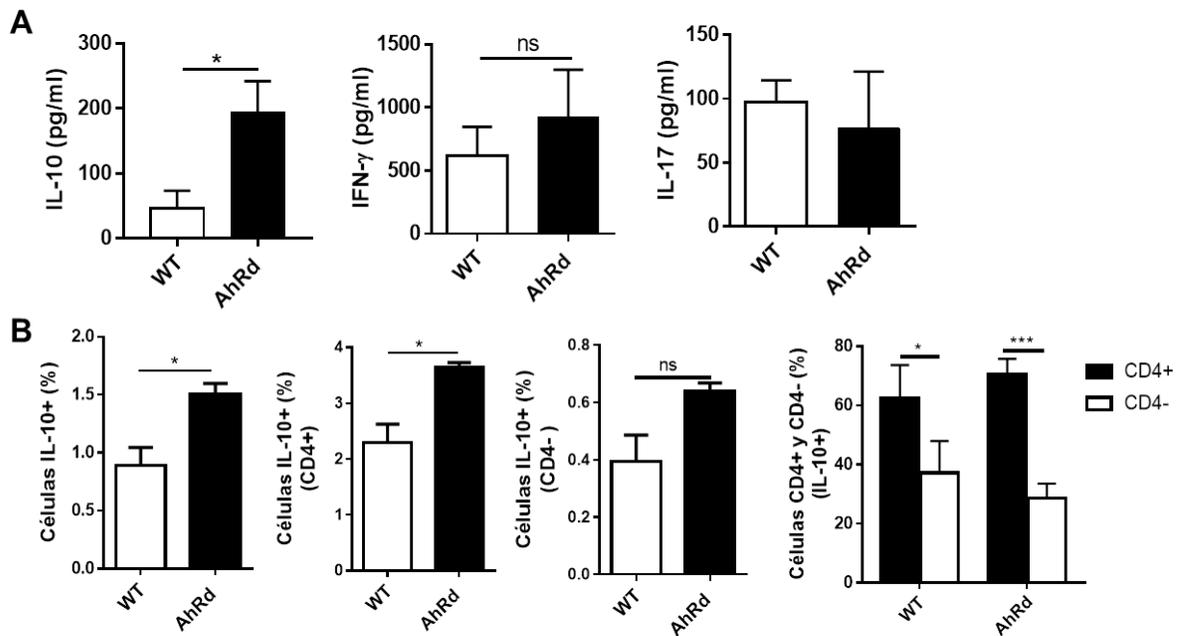
en los ratones AhRd, el número de células CD4+ productoras de IFN- $\gamma$  fue similar en los días 10 y 17 pi mientras que en el grupo WT el número de estas células se incrementó casi tres veces entre el día 10 y 17 pi (Figura 17B).

Como se esperaba, teniendo en cuenta que la señalización AhR participa en el desarrollo de las células Treg, los ratones AhRd presentaron menor número y porcentaje de células Treg que los ratones WT (Figura 17C) y, en consecuencia, se observó un aumento en la relación entre células CD4+ convencionales (CD4+CD25-) y Treg en el grupo de ratones AhRd en el día 17 pi (Figura 17C).

La evaluación de la respuesta sistémica de citoquinas en suero mostró que la concentración de las citoquinas proinflamatorias IFN- $\gamma$  e IL-17 en la etapa aguda de la infección es similar en ambos grupos de ratones (Figura 18A); sin embargo, se observó que la concentración sérica de IL-10 y el porcentaje de células esplénicas totales productoras de IL-10 estaban significativamente aumentados en los ratones AhRd respecto de los WT (Figura 18B), siendo la población de células T CD4+ la mayor productora de esta citoquina en el día 10 pi (Figura 18C)

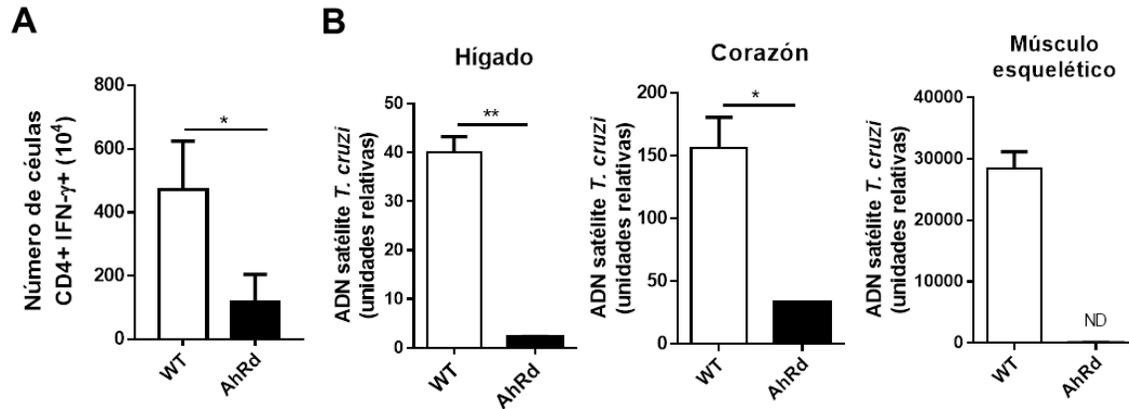


**Figura 17. Rol de la señalización AhR en el desarrollo y la regulación de la respuesta Th1 durante la infección con *T. cruzi*.** Ratones AhRd y WT fueron infectados con 50000 Tps de la cepa Tulahuen de *T. cruzi*. Al día 10 y 17 pi las poblaciones celulares esplénicas fueron estudiadas mediante citometría de flujo. **A)** Número de células totales de bazo. **B)** Número absoluto y porcentaje de células CD4+ productoras de IFN- $\gamma$ . **C)** Número absoluto y porcentaje de células CD4+CD25+Foxp3+ y relación entre células convencionales (CD4+ D25-) y células Treg (CD4+CD25+Foxp3+). Los resultados se muestran como el promedio de los valores obtenidos  $\pm$  DE. Día 10 pi: WT y AhRd, n=3; día 17 pi: WT, n=4; AhRd, n=3. La significancia estadística se calculó usando la prueba *t* de Student comparando entre grupos a un mismo tiempo de infección. Las diferencias significativas entre los grupos WT y AhRd se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$  y (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .



**Figura 18. La señalización vía AhR restringe la producción de IL-10 en la fase aguda de la infección con *T. cruzi*.** A) Concentración de citoquinas en suero de ratones AhRd y WT al día 17 pi. B) Porcentaje de células IL-10+, IL-10- dentro de la población CD4+ y CD4- y porcentaje de células CD4+ y CD4- presentes en la población productora de IL-10, en bazo al día 10 pi. Los resultados en los gráficos de barra se muestran como el promedio de los valores obtenidos  $\pm$  DE. Día 10 pi: WT y AhRd, n=3; Día 17 pi: WT, n=4; AhRd n=3. La significancia estadística se calculó usando la prueba *t* de Student. Las diferencias significativas entre los grupos WT y AhRd se indican como (\*)  $p \leq 0,05$  y (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ . (ns=no significativo)

El estudio de la respuesta inmune específica y la carga parasitaria en la etapa crónica de la infección (día 170 pi) reveló que los ratones AhRd vs los WT presentan un menor número de células CD4+ específicas capaces de producir IFN- $\gamma$  cuando son estimuladas *in vitro* con antígenos del parásito (Figura 19A), hecho que se correlaciona con la menor carga parasitaria observada en hígado, corazón y músculo esquelético en los ratones AhRd (Figura 19B).



**Figura 19. La respuesta inmune generada en los ratones AhRd fue capaz de restringir la replicación parasitaria en los tejidos.** Ratones AhRd y WT fueron infectados con 50000 Tps de la cepa Tulahuen de *T. cruzi*. **A)** Al día 170 pi las poblaciones celulares esplénicas fueron estudiadas mediante citometría de flujo. Número absoluto de células de bazo CD4+ IFN- $\gamma$ + luego de 4 horas de estimulación con un lisado total de *T. cruzi*. **B)** Carga parasitaria en hígado, corazón y músculo esquelético determinada en el grupo de animales Control y AhRd, al día 170 pi (n=4 para cada grupo). Se normalizó la expresión de ADN parasitario a la GAPDH murina. La significancia estadística se calculó utilizando la prueba *t* de Student. Las diferencias significativas entre los grupos Control y AhRd se indican como (\*)  $p \leq 0,05$  y (\*\*)  $p \leq 0,01$ .



## CONCLUSIONES II

La activación de AhR con TCDD, un ligando con alta afinidad y de muy lenta metabolización, antes o durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*, disminuye la resistencia a la infección por un mecanismo que involucra la inhibición de la respuesta inmune protectora e inflamatoria por inducción de apoptosis en células T activadas y la promoción de células Treg productoras de TGF-  $\beta$ .

La activación de AhR con la combinación de los ligandos ITE + 3HK, dos ligandos fisiológicos de rápida metabolización, durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi* promueve la diferenciación de células Treg, pero tiene efectos perjudiciales sobre la inmunidad parásito específica.

Las células Treg, a diferencia de las células T convencionales, mostraron ser resistentes a la muerte inducida por TCDD.

Estos resultados nos permiten concluir que la administración de ligandos de AhR durante la infección con *T. cruzi* es capaz de favorecer el desarrollo de una respuesta regulatoria que podría mantenerse durante la etapa crónica de la infección. Sin embargo, la expansión de células Treg durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi* condiciona la aparición de una respuesta inmune protectora parásito específica, influyendo de manera crítica en la resistencia del hospedador frente a la infección. Por otro lado, de los experimentos realizados en ratones AhRd, donde la señalización AhR es deficiente, se desprende que la señalización AhR por ligandos que se producen durante la infección condiciona el desarrollo de una óptima y robusta respuesta Th1 específica capaz de eliminar el parásito y su correcta contracción para evitar la inmunopatología.



## RESULTADOS III

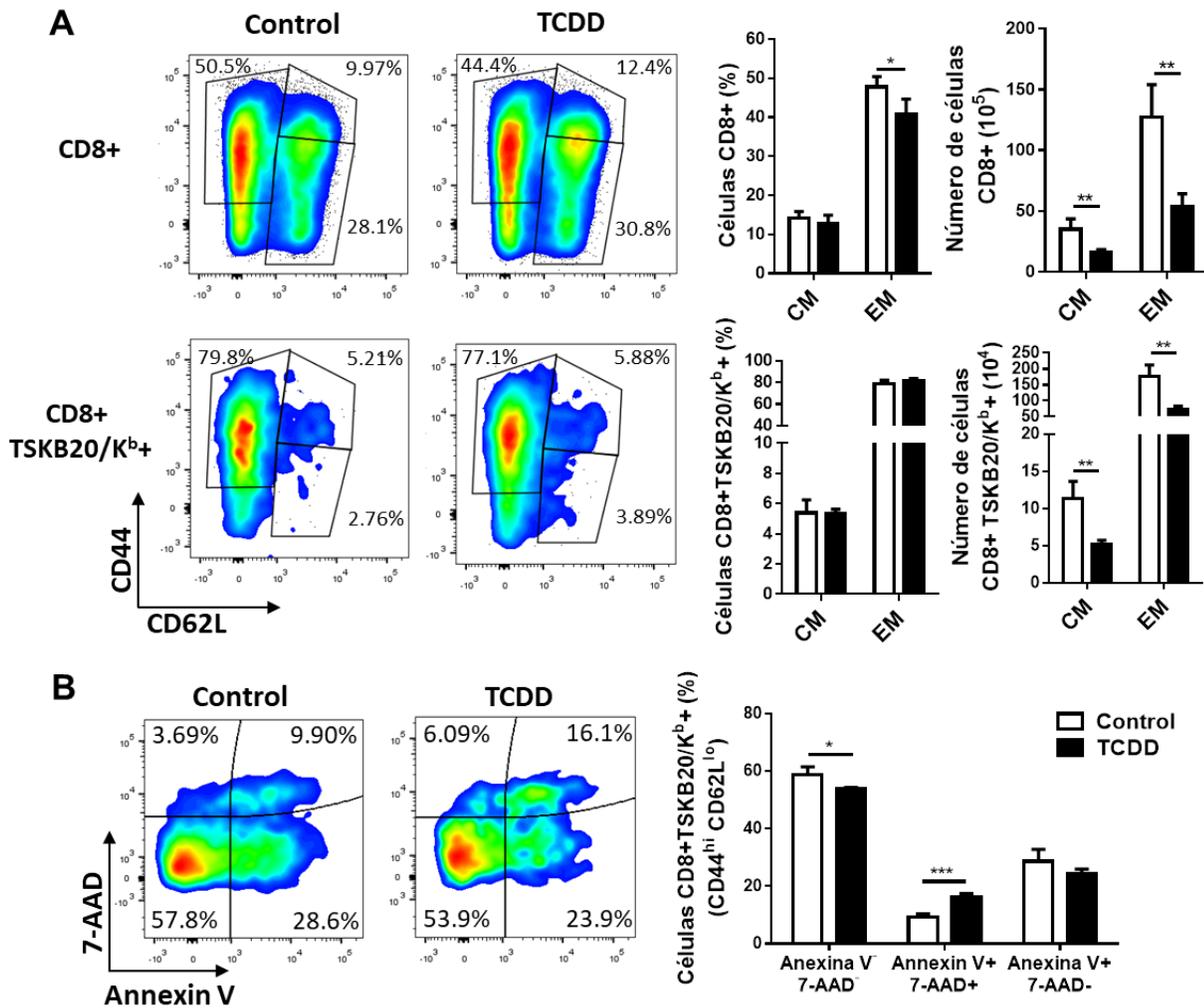


## La señalización de AhR restringe la diferenciación de células T CD8+ de memoria durante la infección con *T. cruzi*

Distintos reportes sugieren que AhR podría, de manera directa o mediante su acción sobre las células presentadoras de antígeno, modular eventos que resultan críticos para la activación de células T vírgenes, influyendo en el desarrollo de las poblaciones de células T efectoras y de memoria.<sup>150,175</sup>

Con la finalidad de estudiar el rol de AhR en el desarrollo de la memoria inmunológica, se analizó la diferenciación de las poblaciones T CD8+ de memoria debido a que se contaba con la herramienta del tetrámero que permite evaluar en la población de células T CD8+ específicas contra el parásito (TSKB20/Kb+) diferentes marcadores de las poblaciones de memoria central (MC) y efectoras/memoria efectora (ME). Así, se evaluó el desarrollo de células de memoria en los modelos experimentales descritos en el Capítulo II: tratamientos *in vivo* antes o durante la infección con diferentes ligandos de AhR que se diferencian en la “fuerza” con que se unen a AhR, considerando como fuerza a la potencia del ligando, la cual está relacionada con su farmacocinética, biodisponibilidad y tiempo de unión al receptor. Así se puede considerar que TCDD activa AhR con fuerza alta y sostenida mientras que la combinación de 3-HK + ITE lo hace en fuerza baja y en los ratones AhRd la fuerza es muy débil. En la Figura 20A se observa que los ratones tratados con TCDD presentan en bazo menor frecuencia de células CD8+ totales de ME (CD8+CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>lo</sup>) y menor número absoluto de células CD8+ totales con el fenotipo de ME y MC (CD8+CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>hi</sup>) que los ratones Control en el día 10 pi. Al analizar la población de ME y MC CD8+ específicas (TSKB20/ Kb+) también se observó que el número de estas células se encontraba disminuido en el bazo de los ratones tratados con TCDD vs ratones Control. Estos resultados sugieren un efecto negativo producido por una activación fuerte de AhR sobre el desarrollo de precursores de células CD8+ de memoria y efectoras. Sin embargo, debido a que las células que han reconocido al antígeno son las que sufren los efectos directos de la toxicidad de TCDD (Figura 7B), este modelo experimental no permite concluir de manera clara respecto a las consecuencias de la activación de AhR en el desarrollo de precursores de memoria. En este sentido, cabe destacar que en el grupo de ratones tratados con TCDD las células CD8+

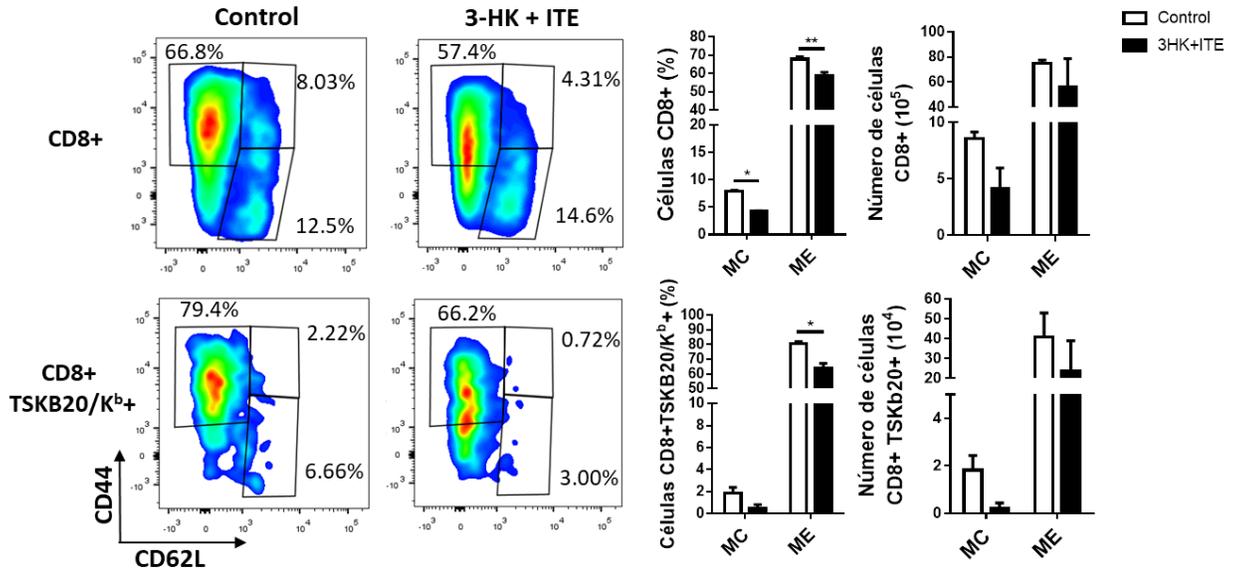
específicas que presentan fenotipo de ME son las que presentaron un mayor porcentaje de células Anexina V+ 7AAD+ (Figura 20B).



**Figura 20. Efecto del tratamiento con TCDD sobre las poblaciones de linfocitos T de memoria CD8+.** A) Gráficos de puntos representativo (izquierda) y barras mostrando el porcentaje y número absoluto (derecha) de células de MC (CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) y ME (CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>) en las poblaciones CD8+ y CD8+ TSKB20/K<sup>b</sup> en bazo. B) Gráficos de puntos representativos (izquierda) y barras (derecha) mostrando el porcentaje de esplenocitos Anexina V- 7-AAD-, Anexina V+ 7AAD- y Anexina V+ 7AAD+ en la población de células CD8+ y CD8+ TSKB20/K<sup>b</sup> en animales tratado con TCDD y Control al día 10 pi. Las barras representan el promedio de los valores obtenidos ± DE. Control, n=5; TCDD, n=4. La significancia estadística se calculó utilizando la prueba t de Student. Las diferencias significativas entre los grupos Control y TCDD se indican como (\*) p≤0,05; (\*\*) p≤0,01 y (\*\*\*) p≤0,001.

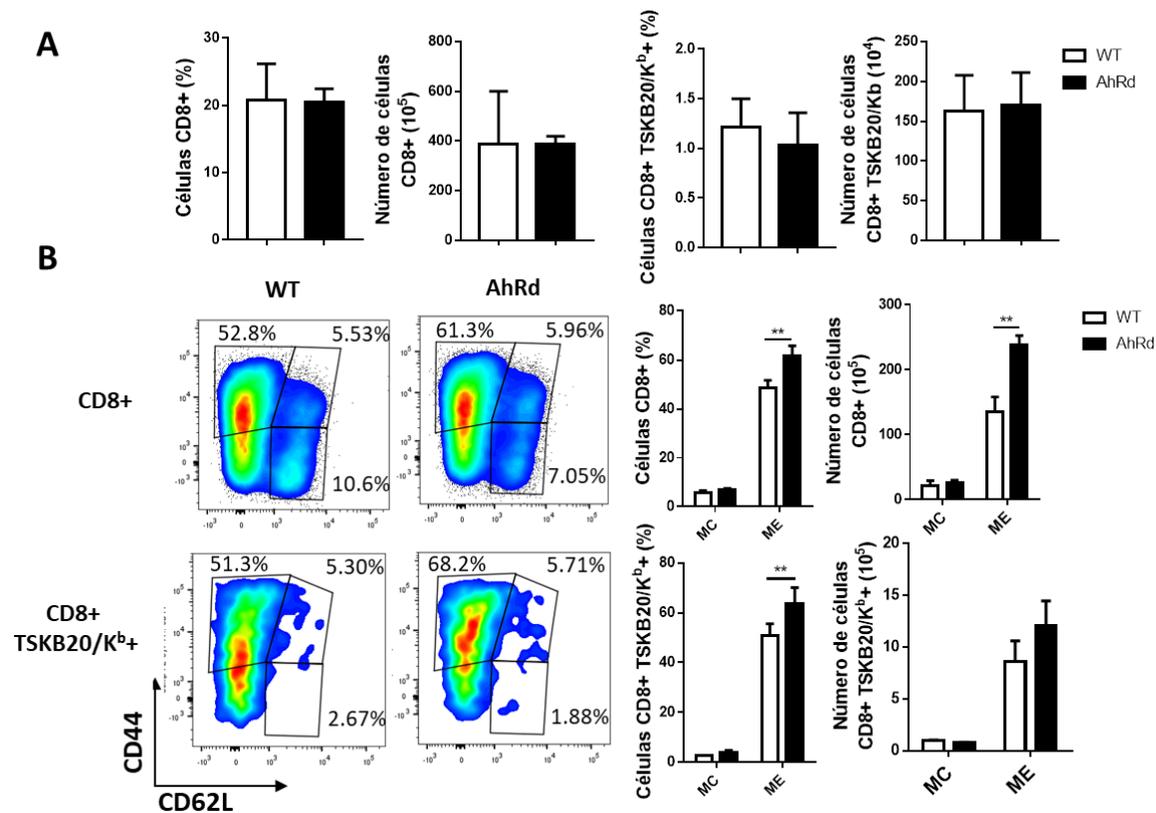
A los fines de poner a prueba la hipótesis de que la activación de AhR *in vivo* altera la frecuencia de las subpoblaciones de células CD8+ totales y específicas de memoria, se analizó la fase de inducción de la respuesta de memoria en ratones B6 infectados con *T. cruzi* a los que se

trató con 3-HK + ITE de acuerdo al esquema presentado en la Figura 10. Como muestra la Figura 21, la activación de AhR mediada por 3-HK + ITE durante la infección con *T. cruzi* disminuye el porcentaje de células esplénicas CD8+ totales y CD8+ específicas que adquieren el fenotipo de ME y MC.



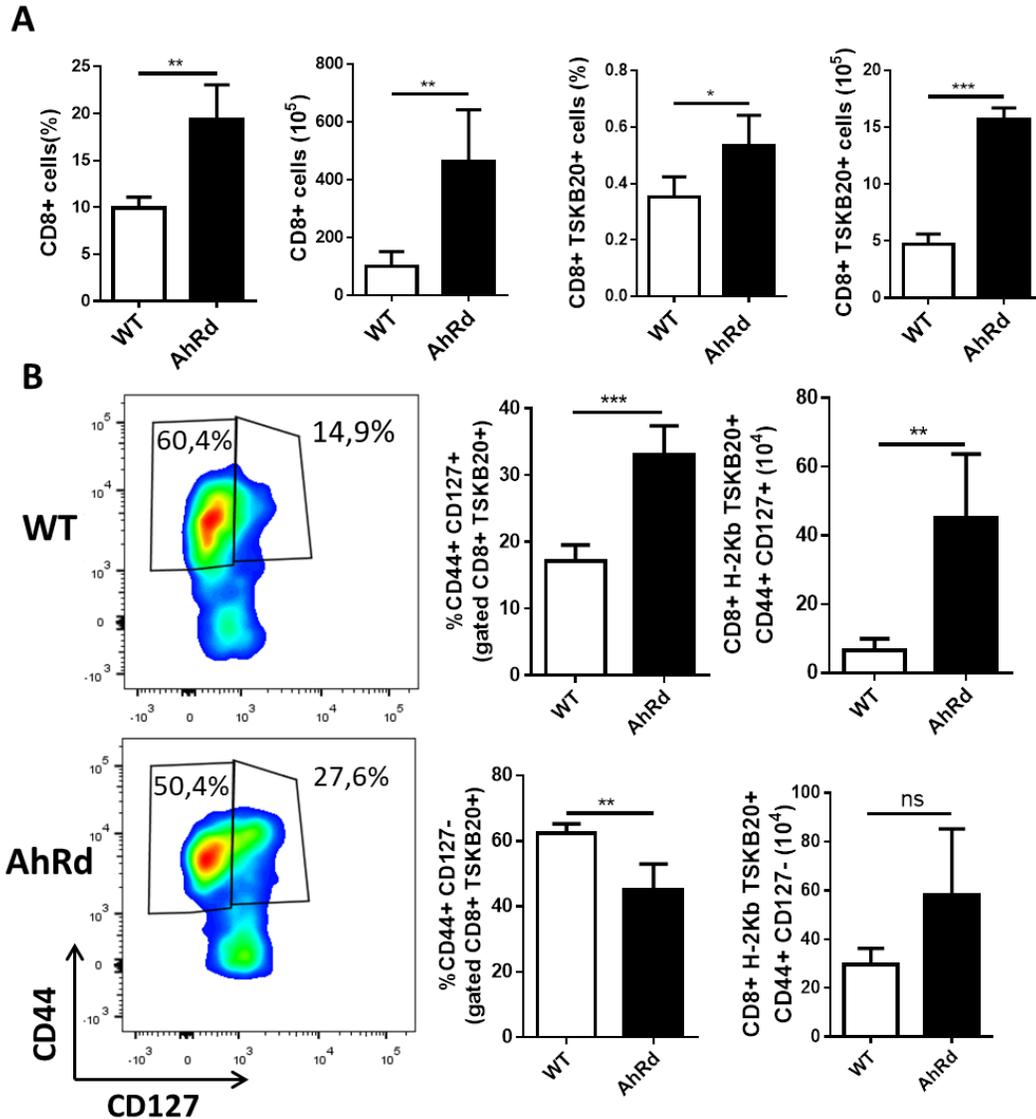
**Figura 21.** . Efecto del tratamiento con 3-HK + ITE sobre las poblaciones de linfocitos T de memoria CD8+. Gráfico de puntos representativo (izquierda) y barras (derecha) mostrando el porcentaje de células de MC (CD44+ CD62L+) y ME (CD44+ CD62L-) en las poblaciones CD8+ y CD8+ TSKB20/Kb+ de bazo. Las barras de los gráficos representan el promedio de los valores obtenidos  $\pm$  DE. Control, n=3; 3-HK+ITE, n=3. La significancia estadística se calculó utilizando la prueba t de Student. Las diferencias significativas entre los grupos Control y 3-HK + ITE se indican como (\*)  $p \leq 0,05$  y (\*\*)  $p \leq 0,01$ .

Para corroborar estos hallazgos, comparamos la frecuencia y el número absoluto de células CD8+ específicas de ME y MC presentes en bazo de ratones AhRd y WT en los días 17 y 170 pi. Los ratones AhRd y WT presentaron, en el día 17 pi similar frecuencia y número absoluto de células CD8+ específicas (Figura 22A), mientras que el análisis de las poblaciones de ME y MC evidenció que los ratones AhRd presentan mayor frecuencia de células CD8+ totales y específicas con el fenotipo de ME que los ratones WT (Figura 22B).



**Figura 22.** Poblaciones de células T CD8+ de memoria en ratones AhRd que cursan en la fase aguda de la infección con *T. cruzi*. Esplenocitos de ratones AhRd y WT infectados se aislaron al día 17 pi y las poblaciones de células T CD8+ se analizaron mediante citometría de flujo. **A)** Porcentaje y número absoluto de células CD8+ TSKB20/Kb+ en bazo. **B)** Gráficos de punto representativo (izquierda) y de barras (derecha) mostrando el porcentaje y número absoluto de células de MC (CD44+ CD62L+) y ME (CD44+ CD62L-) dentro de las poblaciones CD8+ y CD8+ TSKB20/Kb+ en bazo. Las barras de los gráficos representan el promedio de los valores obtenidos  $\pm$  DE. Control, n=3 y AhRd, n=4. La significancia estadística se calculó utilizando la prueba t de Student. Las diferencias significativas entre los grupos se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$  y (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .

En concordancia con los resultados observados en la etapa aguda, los animales AhRd presentaron mayor porcentaje y número absoluto de células CD8+ y CD8+ específicas que los ratones WT en la etapa crónica de la infección (170 pi) (Figura 23A). Además, el estudio de las subpoblaciones de memoria en los linfocitos CD8+ específicos teniendo en cuenta la expresión de los marcadores CD44 y CD127, que distinguen células de MC (CD44<sup>hi</sup> CD127<sup>hi</sup>) y ME (CD44<sup>hi</sup> CD127<sup>lo</sup>), demostró que el porcentaje y número absoluto de células CD8+ específicas con fenotipo de MC se encontraron aumentadas en bazo de los ratones AhRd vs WT (Figura 23B).



**Figura 23.** Poblaciones de células T CD8+ de memoria en ratones AhRd que cursan en la fase crónica de la infección con *T. cruzi*. Esplenocitos de ratones AhRd y WT infectados se aislaron al día 170 pi y las poblaciones de células T CD8+ se analizaron mediante citometría de flujo. **A)** Porcentaje y número absoluto de células CD8+ y CD8+ TSKB20/Kb+ en bazo en el día 170 pi. **B)** Gráficos de punto representativos (izquierda) y barras (derecha) indicando del porcentaje de células de CD44+ CD127+ (MC) y CD44+ D127- (ME) dentro de la población de linfocitos CD8+TSKB20/Kb+. Las barras representan el promedio de los valores obtenidos  $\pm$  DE. Control, n=4 y AhRd, n=4. La significancia estadística se calculó utilizando la prueba *t* de Student. Las diferencias significativas entre los grupos se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$  y (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .



## CONCLUSIONES III

La activación fuerte de AhR con TCDD que incrementa la apoptosis en las células de memoria efectora podría ser la causa de la disminución en el número de células CD8+ y CD8+ específicas de memoria efectora y memoria central observada en bazo de ratones tratados con TCDD en la fase aguda de la infección.

El modelo de tratamiento de activación débil de AhR con 3-HK + ITE permitió concluir que la señalización AhR inhibe el desarrollo de las células de memoria.

El modelo de infección con *T. cruzi* en ratones AhRd permitió corroborar los resultados obtenidos con los modelos de activación de AhR mostrando que la falta de señalización AhR promueve el desarrollo de poblaciones de memoria.

Estos resultados sugieren que durante la infección con *T. cruzi* la activación fisiológica de AhR, mediante la unión a ligandos endógenos generados durante la infección, restringe la diferenciación de las células T CD8+ de memoria impactando en la magnitud de la respuesta inmune específica de larga vida contra el parásito.



## RESULTADOS IV





## **Perfil diferencial de metabolitos del triptófano en plasma de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica.**

Luego de que se genera un proceso inflamatorio se ponen en marcha distintos mecanismos regulatorios para controlarlo y limitar así el daño tisular que puede ocasionar la liberación crónica de mediadores inflamatorios. Entre los mecanismos que participan en la regulación de la respuesta inflamatoria se encuentra la activación del eje IDO-AhR. Así, se ha reportado que algunos de los productos de la degradación del Trp por IDO son ligandos de AhR que pueden activar este receptor e iniciar mecanismos de regulación de la inflamación.<sup>92,117</sup> Expresado de otra manera, en los procesos inflamatorios crónicos como los que presentan los pacientes infectados con *T. cruzi*, la modulación de los niveles de agonistas de AhR en suero y la actividad de AhR podría jugar un rol importante en el mantenimiento del proceso inflamatorio característico de la CCC.

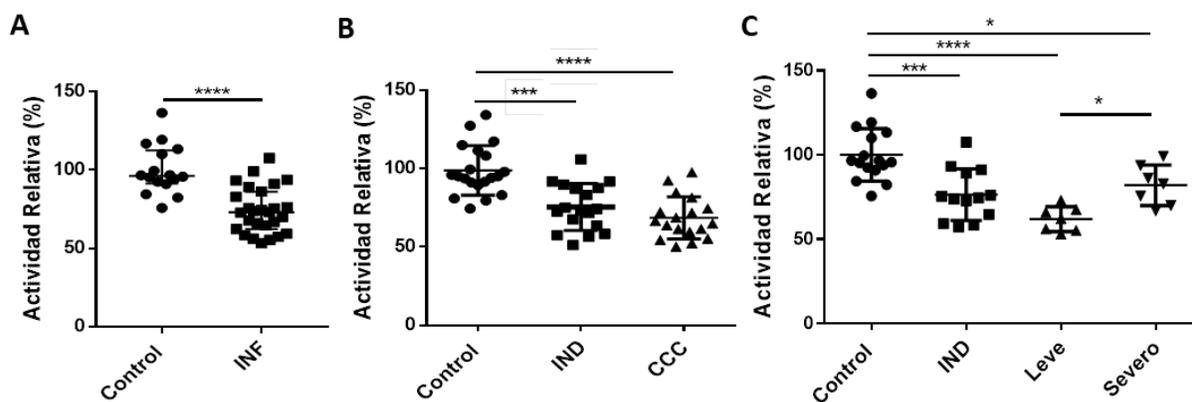
Con el objetivo de evaluar la presencia de ligandos de AhR en suero, se analizaron muestras de plasma obtenidas de pacientes que se encuentran en la etapa crónica de la infección y de individuos no infectados (Control). Las muestras se clasificaron como no infectados (Control) e infectados (INF); a su vez los individuos infectados se agruparon en asintomáticos o indeterminados (IND), y los que presentaban CCC se subdividieron en Leve o Severo teniendo en cuenta la presencia de alteraciones electrocardiográficas (ECG) y en la radiografía (RX) de tórax. Las muestras que constituyeron cada grupo de pacientes fueron seleccionadas teniendo en cuenta la distribución de edad y sexo: promedio de edad, los valores de los percentiles 25 y 75 respecto de las edades y el porcentaje de muestras provenientes de individuos del sexo femenino (Tabla 1).

Grupo	Sexo femenino	Edad
Control (17)	13 (76,5)	46,52 (39-53)
INF (29)	20 (68,9)	49,48 (41-53)
Control (25)	16 (64)	42,15 (37-50)
IND (18)	12 (66,7)	45,61 (40-53)
CCC (18)	12 (66,7)	46,5 (41-55)
Control (17)	12 (70,58)	43,37 (41-54)
IND (15)	10 (66,67)	49,61 (40-57)
Leve(7)	6 (85,1)	50,14 (41-55)
Severo (7)	5 (71,42)	48,85 (42-53)

**Tabla 1. Distribución de edad y sexo entre los diferentes grupos de pacientes y controles.** Columna grupo: nombre de cada grupo tal y como se muestra en el/los gráfico/s, entre paréntesis el tamaño de la muestra. Columna sexo: los números representan, de izquierda a derecha, número absoluto de personas del sexo femenino y entre paréntesis el porcentaje que representan. Columna edad: de izquierda a derecha, promedio de la edad, entre paréntesis, el valor del percentil 25 y el 75.

En primer lugar, se analizó la presencia global de ligandos de AhR circulantes en plasma de individuos Control y pacientes INF, utilizando el sistema de plásmidos reporteros descrito para ratones Balb/c y B6 pero realizando la transfección en una línea celular de origen humano (HEK 293). Se detectó una disminución global de la actividad agonista de AhR en el suero de los pacientes infectados con *T. cruzi* en relación con el grupo Control no infectado (Figura 24A). Cuando el análisis de estos resultados se realizó clasificando las muestras de los pacientes infectados crónicos según presentaran (CCC) o no (IND) patología cardiaca, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes INF (IND y CCC). Sin embargo, los resultados parecen mostrar una

tendencia negativa entre la actividad agonista AhR en suero y la presencia de infección o de infección asociada a cardiopatía chagásica (Figura 24B). Cuando los pacientes CCC fueron subclasificados según el grado de patología cardíaca en Leve o Severa, se observó que la actividad agonista en suero de pacientes con patología cardíaca Leve es significativamente menor que la detectada en sueros IND y en sueros de pacientes con patología cardíaca Severa (Figura 24C).



**Figura 24. Actividad de ligandos de AhR en suero de pacientes cursando la etapa crónica de la infección con *T. cruzi* y controles no infectados. A)** Actividad relativa de luciferasa en plasma de individuos Control e infectados (INF). Los resultados se muestran como el promedio de los valores obtenidos  $\pm$  DS. **B)** Actividad relativa de luciferasa en plasma de individuos Control, IND y con CCC **C)** Actividad relativa de luciferasa en plasma de individuos Control, IND y que presentan cardiopatía Leve o Severa. La significancia estadística se calculó utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Las diferencias significativas entre los grupos se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,01$  y (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

Debido a que se ha reportado que algunos catabolitos del Trp son también ligandos de AhR, se utilizó metabolómica dirigida mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) con el objetivo de identificar cambios en las concentraciones de metabolitos derivados del Trp en suero que pudieran generarse en la infección o que fueran características de cada uno de los grupos en los que se clasificaron las muestras de los pacientes infectados crónicos. Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) de los metabolitos pertenecientes a las vías de degradación del Trp teniendo en cuenta los Componentes Principales (CP) 1 y 2. En este tipo de análisis el CP1 es el que contribuye en mayor medida a la variabilidad observada

entre las muestras, seguido del CP2. En este caso los CP1 y 2 explican alrededor del 47% de la información introducida (Figura 25). El CP1 da cuenta de la variabilidad observada entre el grupo Control y los pacientes infectados, ubicándose del lado derecho del gráfico la mayor cantidad de valores correspondientes a las muestras de pacientes infectados y del lado izquierdo a los del grupo Control. Por su parte, la variabilidad reflejada en el CP2 muestra las diferencias entre los sueros de pacientes que presentan cardiopatía severa y los demás grupos.

En el gráfico Biplot de la Figura 26 se encuentra representada la asociación entre los metabolitos y los distintos grupos de pacientes. En este gráfico sólo se representaron los metabolitos que contribuyen en mayor medida a las diferencias observadas en cada uno de los CP (Tabla 2). Cuando los ángulos entre vectores son pequeños, como los que se observan del lado derecho del CP1, indican que esas variables se encuentran relacionadas fuerte y positivamente, es decir que si una está aumentada es probable que la otra también lo esté; ángulos cercanos a  $90^\circ$  nos indican que no hay una dependencia entre las variables y ángulos de  $180^\circ$  indican una correlación negativa. Realizando este análisis en el CP1, se pudo observar que los metabolitos N-metilserotonina, 5-hidroxitriptófano, serotonina, triptamina y ácido picolínico (Tabla 2) están correlacionadas de manera positiva. Los tres primeros pertenecen a la misma vía de metabolización del Trp denominada vía de la serotonina (lo que podría explicar su cercanía).

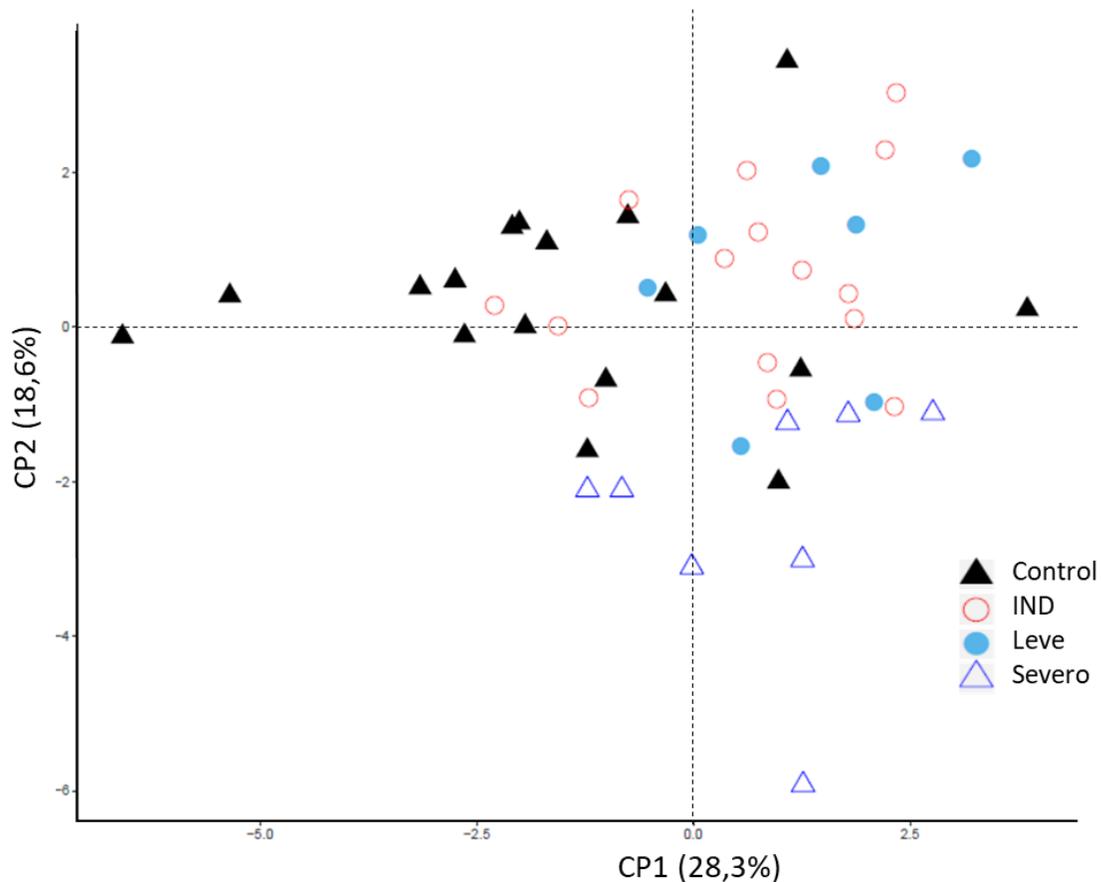


Figura 25. Análisis de componentes principales de metabolitos del Trp en sueros de individuos sanos y en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas. Gráfico de plano principal en el cual cada símbolo representa una muestra.

De manera interesante, tanto en la vía de la serotonina como para la conversión de Trp en triptamina interviene la enzima Trp descarboxilasa (base de datos de la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto, KEGG). En el CP2, los vectores que más contribuyen a la distribución observada son los correspondientes a Trp y KYN y en menor medida N-acetilserotonina y ácido quinolínico (Tabla 2), estos metabolitos también presentan una correlación positiva entre sí.

Así, se observa que los metabolitos que contribuyen a la separación dada por CP1 (N-metilserotonina, 5-hidroxitriptófano, serotonina, triptamina y ácido picolínico), se encuentran aumentados en las muestras de pacientes infectados. Además, al analizar la cercanía entre los vectores y las muestras de los pacientes infectados, se observó que las

muestras de los grupos IND y Leve se ubican más cerca de estos los vectores que las muestras del grupo Severo, indicando que estos compuestos estarían menos representados en sueros de pacientes con cardiopatía severa. Por otro lado, Trp, KYN, N-acetilserotonina y ácido quinolínico, que contribuyen a la separación dada por CP2, estarían más aumentados en los sueros de los individuos con cardiopatía severa.

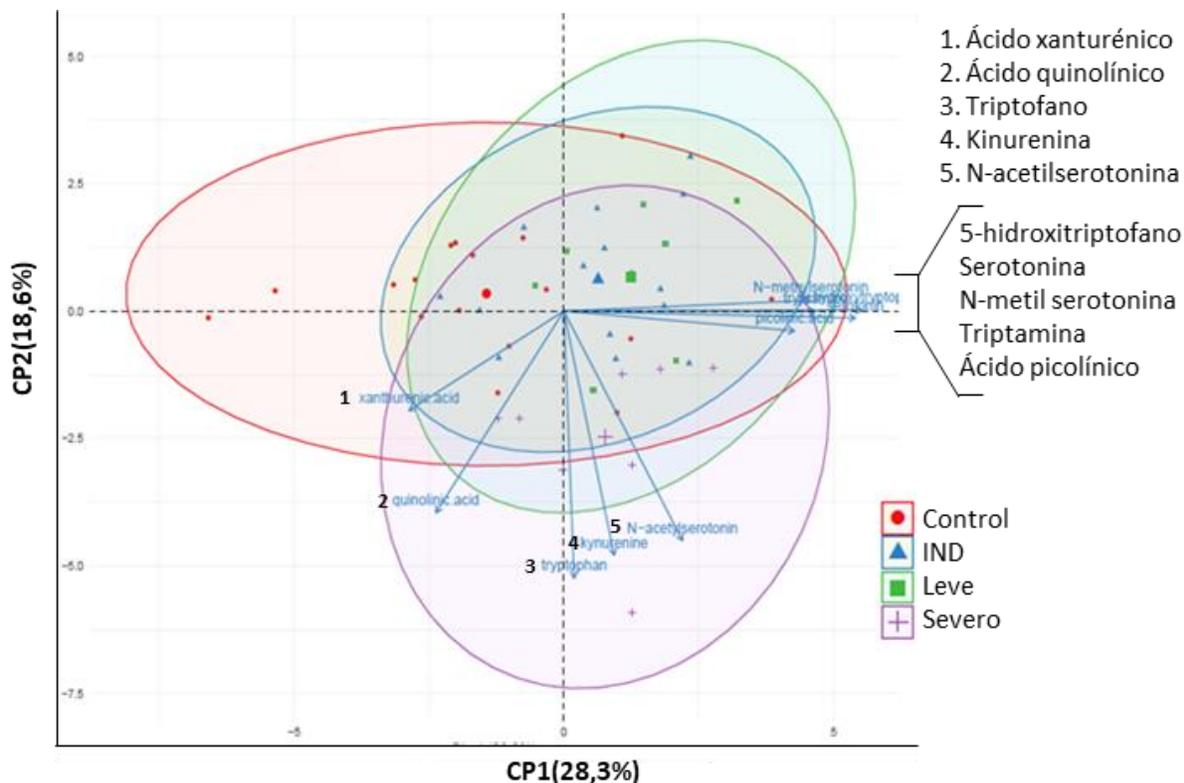


Figura 26. Principales metabolitos del Trp que contribuyen a la separación entre los grupos. Gráfico Biplot: cada símbolo representa una muestra y los metabolitos están representados como vectores que contribuyen en mayor medida a la separación observada.

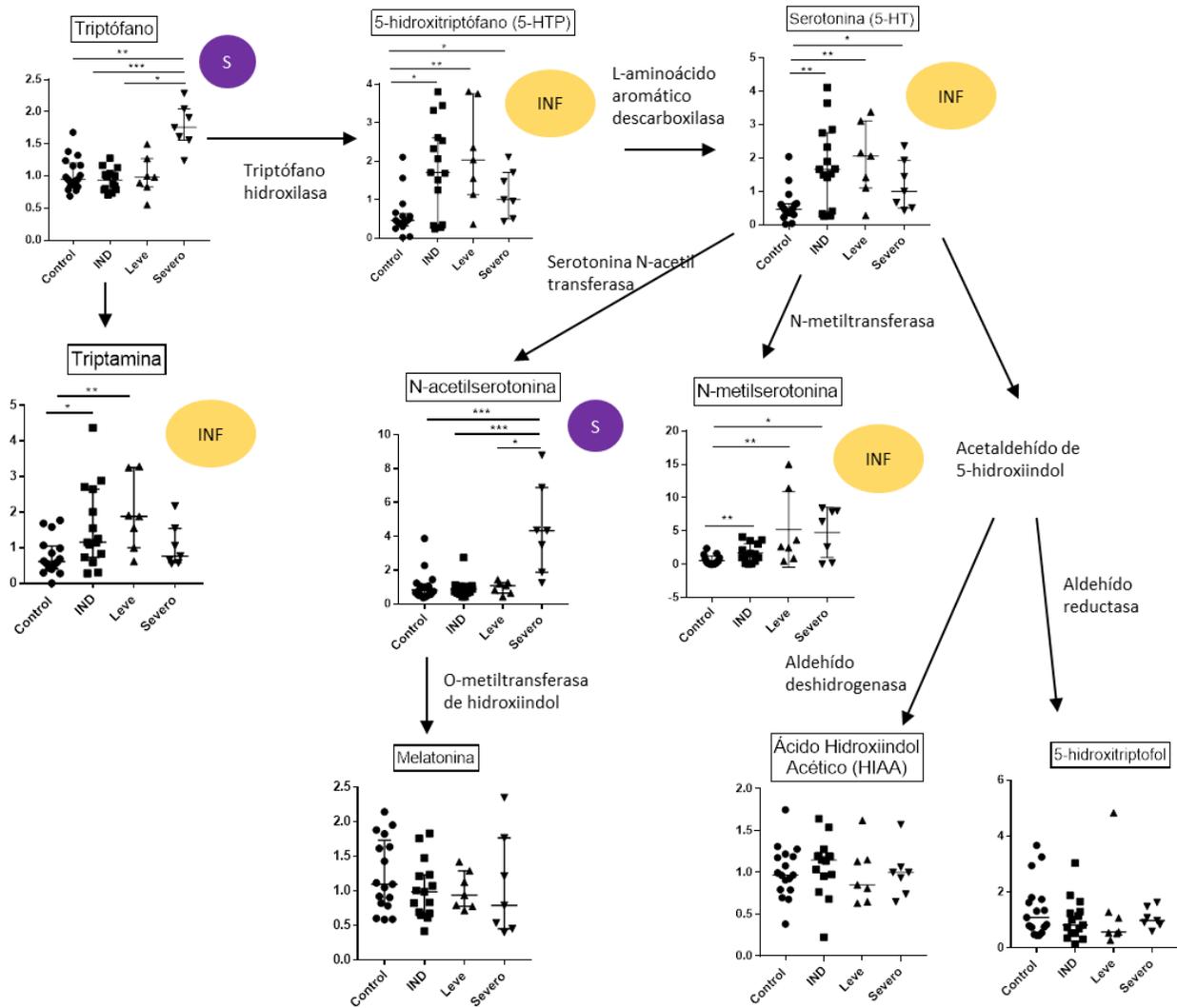
A los fines de corroborar estas observaciones, se analizaron los metabolitos de manera individual en cada uno de los grupos. Siguiendo lo reportado por Girones y col.<sup>176</sup>, a los fines de normalizar los resultados y expresarlos en el gráfico, se le asignó el valor 1 a la mediana de los valores obtenidos para cada metabolito y a cada muestra el valor relativo correspondiente. Se observó que los metabolitos N-metilserotonina, 5-hidroxitriptófano, serotonina y triptamina, que contribuyen en mayor medida en la

separación dada por el CP1 (separando al grupo Control del infectado), se encuentran significativamente aumentados en plasma de pacientes INF respecto al Control (Tabla 2). Sin embargo, al separar a los pacientes INF en IND, Leves y Severos, sólo 5-hidroxitriptófano, serotonina y N-metil serotonina se encuentran significativamente aumentados respecto a los controles en todos los grupos infectados (Figura 27). Por otro lado, en la sección negativa del CP1 del gráfico Biplot se observó que el vector correspondiente al ácido xanturénico se ubica próximo a los puntos que representan las muestras de suero del grupo Control (Figura 26), por lo que debería encontrarse aumentado respecto a los INF. De igual manera, si bien no aparece en el gráfico Biplot debido a su menor valor de contribución en el CP1, el ácido kinurénico también se ubica en la sección negativa del CP1, con un valor de contribución al CP muy cercano al del ácido xanturénico (Tabla 2). El análisis de la presencia de ácido xanturénico y ácido kinurénico mostró que estos metabolitos se encuentran significativamente aumentados en suero de pacientes Control respecto a los INF (Figura 28) y dado que estos compuestos son ligandos de AhR podrían contribuir a la mayor actividad global de AhR observada en sueros Control (Figura 24A). Por otro lado, se observó que las muestras del grupo Severo presentaba niveles significativamente mayores de Trp, KYN, ácido quinolínico y N-acetilserotonina que las de los grupos IND y Leve. En todos los casos, excepto en el del ácido quinolínico, los valores obtenidos para cada uno de estos metabolitos fueron además significativamente mayores en las muestras del grupo Severo que en las del grupo Control (Figura 27 y 29). De manera interesante, los niveles de N-acetilserotonina detectados en muestras de pacientes Severos fueron 4 veces mayores que los hallados en las muestras de los demás grupos.

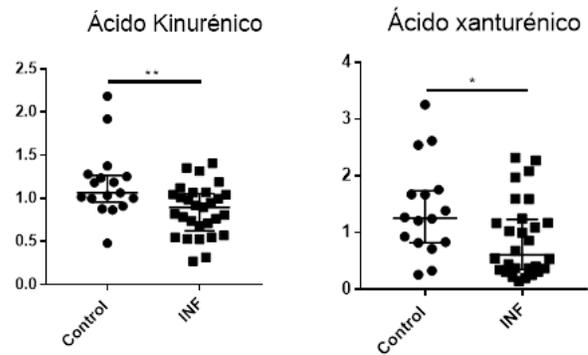
Los resultados indican que la infección con *T. cruzi* modula de manera diferencial el perfil de metabolitos del Trp observado en los distintos grupos de pacientes infectados crónicos, por lo que algunos de estos metabolitos podrían resultar de utilidad como biomarcadores de la enfermedad o indicadores de severidad.

Metabolito	Correlación (CP1)	<i>p</i>	Control vs INF
5-hidroxitriptófano	0.921366039	4.358277844e-20	<i>P</i> =0,001
Serotonina	0.901576934	5.502472549e-18	<i>P</i> =0,0006
Triptamina	0.779310299	1.099461905e-10	<i>P</i> =0,0057
N-metilserotonina	0.763500713	4.348586873e-10	<i>P</i> =0,0003
Ácido picolínico	0.713630502	1.798584984e-08	<i>P</i> =0,0994 (ns)
Ácido xanturénico	-0.47872820	0.00066415941	<i>P</i> =0,00297 <sup>a</sup>
Ácido kinurénico	-0.35989178	0.01296474022	<i>P</i> =0,00980 <sup>a</sup>
Metabolito	Correlación (CP2)	<i>p</i>	Control vs INF
Triptófano	0.875431158	8.306386897e-16	<i>P</i> =0,4649 (ns)
Kinurenina	0.800332937	1.468716547e-11	<i>P</i> =0,0006
N-acetil serotonina	0.752297048	1.082249074e-09	<i>P</i> =0,1041 (ns)
Ácido quinolínico	0.661191178	4.215150936e-07	<i>P</i> =0,0854 (ns)

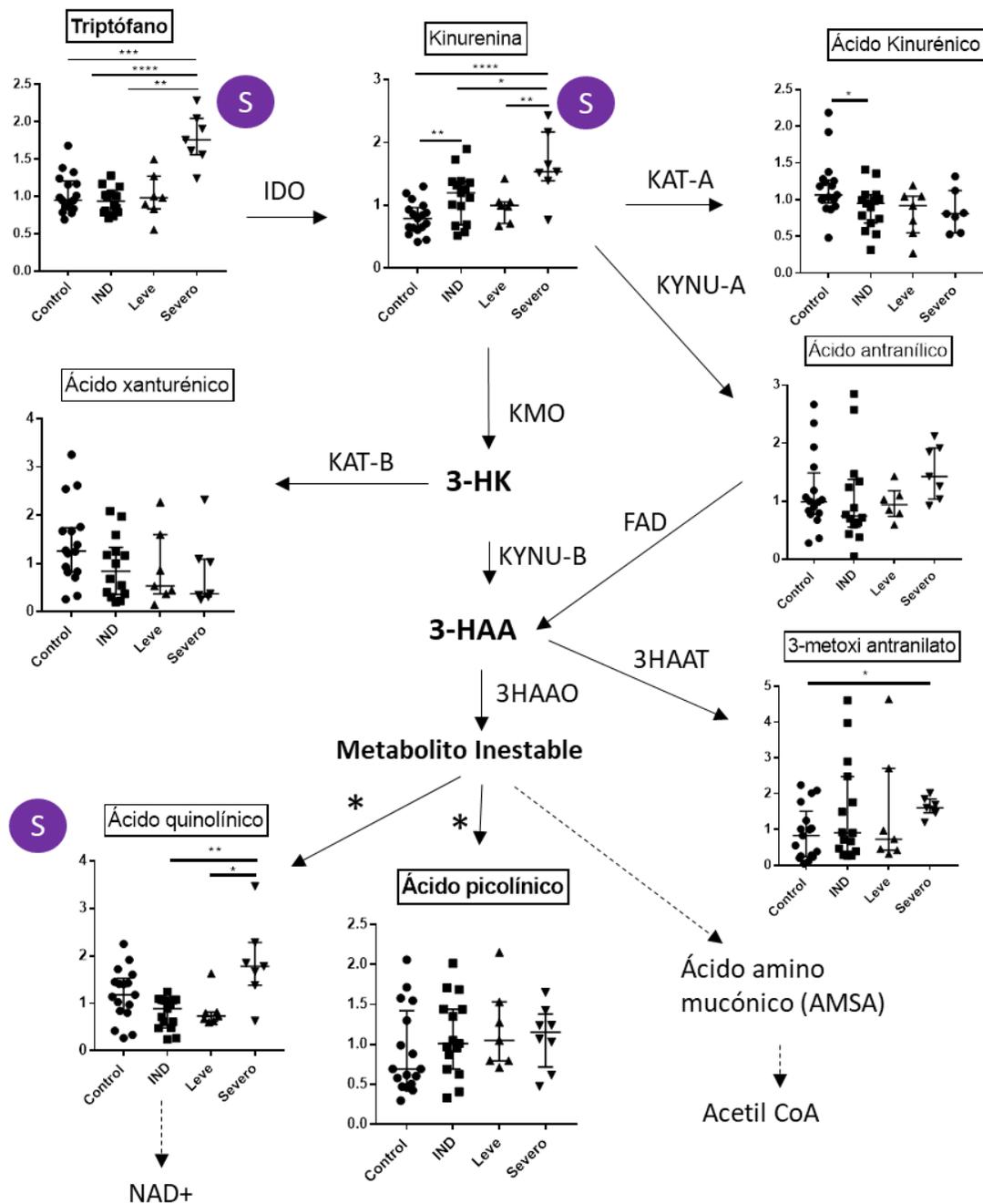
**Tabla 2: Principales metabolitos asociados a las diferencias observadas en el CP1 y CP2 y valores de significancia entre el grupo Control e Infectado para cada uno de los metabolitos.** La columna correlación muestra el valor de correlación del metabolito respecto al eje en el que se encuentra representado, la columna *p* muestra la significancia de la correlación. La columna Control vs infectado muestra el valor de *p* entre estos grupos para el metabolito particular. Los valores de  $p \leq 0,05$  indican un aumento significativo del metabolito en el grupo Infectado respecto al Control, a menos que se indique lo contrario. ns: no significativo, a: los valores son mayores en el grupo Control que en el infectado.



**Figura 27. Metabolitos de la vía de la serotonina y triptamina detectados mediante LC-MS.** Los gráficos muestran valores normalizados de los datos de abundancia relativa de iones obtenidos en la determinación, los datos se graficaron como la mediana y el rango intercuartil. Sobre las flechas se encuentran los nombres de las enzimas involucradas en cada proceso. **S**: indica los metabolitos que en el ACP contribuyen a la separación del grupo Severo. **INF**: indica los metabolitos que en el ACP contribuyen a la separación entre los grupos INF y Control. La significancia estadística se calculó mediante la prueba U de Mann-Whitney. Las diferencias significativas entre los grupos se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  y (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$



**Figura 28. Ácido kinurénico y ácido xanturénico detectados mediante LC.** Los gráficos muestran valores normalizados de los datos de abundancia relativa de iones obtenidos en la determinación, los datos se graficaron como la mediana y el rango intercuartil. La significancia estadística se calculó mediante la prueba U de Mann-Whitney. Las diferencias significativas entre los grupos se indican como (\*)  $p \leq 0,05$  y (\*\*)  $p \leq 0,01$ .



**Figura 29. Metabolitos de la vía de las kinureninas detectados mediante LC-MS.** Los gráficos muestran valores normalizados de los datos de abundancia relativa de iones obtenidos en la determinación, los datos se graficaron como la mediana y el rango intercuartil. Sobre las flechas se encuentran los nombres de las enzimas involucradas cada proceso. S: indica los metabolitos que en el ACP contribuyen a la separación del grupo Severo. IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa, KAT: kinurenina aminotransferasa, KYNU: kinureninasa, KMO: kinurenina monooxigenasa, 3-HAAO: 3-hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa, FAD: antranilato 3-monooxigenasa, 3HAAT: 3-hidroxiantranilato metiltransferasa, NAD: nicotinamida adenina dinucleótido, \*: ciclación no enzimática. La significancia estadística se calculó mediante la prueba Mann-Whitney. Las diferencias significativas entre los grupos se indican como (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0,001$  y (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .

## CONCLUSIONES IV

Los niveles de agonistas de AhR en suero de pacientes infectados con *T. cruzi* son significativamente menores que los detectados en sueros de controles sin infectar.

Los sueros de individuos Control expresan mayores niveles de los ligandos de AhR ácido kinurénico y ácido xanturénico que los de pacientes INF.

Existe una correlación negativa entre la actividad agonista AhR en suero y la presencia de infección y de infección asociada a cardiopatía chagásica.

Los sueros de pacientes con cardiopatía leve presentan menor actividad agonista que la de los pacientes IND y con cardiopatía Severa.

La determinación en plasma de los metabolitos del Trp utilizando metabolómica dirigida mediante LC-MS reveló que:

Los niveles de 5-hidroxitriptófano, serotonina y N-metil serotonina se encuentran significativamente aumentados en plasma de todos los grupos INF respecto al Control.

Los niveles de triptófano, kinurena, y N-acetilserotonina fueron significativamente mayores en el grupo Severo que en los grupos Control, IND y Leve.

Los niveles de N-acetilserotonina detectados en muestras de pacientes Severos fueron 4 veces mayores que los hallados en las muestras de los demás grupos.

Estos resultados indican que en la infección con *T. cruzi* y en los diferentes estadios de la Enfermedad de Chagas crónica se modula de manera diferencial los niveles de agonistas de AhR en suero y el perfil de metabolitos del triptófano, por lo que algunos de estos metabolitos podrían resultar de utilidad como biomarcadores de la enfermedad o indicadores de severidad.



# DISCUSIÓN



La Enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* representa un problema sanitario prioritario en nuestro país. De acuerdo con los datos del Ministerio de Salud de la Nación Argentina alrededor de 2 millones de personas se encuentran infectadas. Se estima que cada año mueren alrededor de 12000 personas debido al desarrollo de cardiopatía chagásica crónica (CCC) que afecta alrededor del 30% de los individuos infectados y que ocurre décadas después de la infección aguda.<sup>177</sup> El resto de los pacientes desarrolla complicaciones digestivas (5-10%) mientras que el 60-70% restante permanece asintomático.<sup>8</sup> Si bien los mecanismos que llevan a que un grupo de individuos desarrolle CCC aún no han sido completamente dilucidados, se conoce que los pacientes con CCC presentan una respuesta inflamatoria más intensa que los asintomáticos, presentan mayores niveles de citoquinas proinflamatorias circulantes, mayor número de células productoras de IFN- $\gamma$  y un menor porcentaje de células productoras de IL-10 y Treg en sangre periférica en comparación a los asintomáticos.<sup>21,54,178-181</sup> Por otro lado, en el modelo de infección con ratones B6 se observó que esta cepa desarrolla una importante respuesta Th1 capaz de controlar la replicación del parásito.<sup>159</sup> Sin embargo, al igual que lo que sucede en los pacientes con CCC los ratones B6 presentan una mayor dificultad para controlar la respuesta inflamatoria, lo que resulta en mayor mortalidad por daño hepático, asociada a altos niveles de TNF y bajos de IL-10 en suero, y a su incapacidad para expandir la población de células Treg, que en paralelo a la gran expansión que sufre el compartimento de células T resulta en una incrementada relación T efectoras/Treg.<sup>58,159</sup>

Recientemente, ha cobrado importancia el estudio de AhR como regulador de la respuesta inmune innata y adaptativa, principalmente debido a las posibilidades terapéuticas que ofrece su manipulación. Se ha descrito que AhR es capaz de inducir la diferenciación de células T hacia un perfil de tipo regulatorio (Treg, Tr1) o inflamatorio (Th17) de acuerdo a la fuerza de activación del ligando y al microambiente de citoquinas presente, entre otros factores.<sup>117,140</sup> Se ha demostrado además, que la activación de AhR puede ser inducida por diversos ligandos presentes en el microambiente, entre ellos los metabolitos del Trp, los cuales han emergido

como un grupo clave dentro de los ligandos agonistas endógenos de este receptor.<sup>109</sup> Durante la infección con *T. cruzi*, el aumento de IDO y posterior catabolismo del Trp en la vía de las kinureninas, tiene dos papeles fundamentales: el controlar del crecimiento del parásito mediante la producción de 3-HK y favorecer la respuesta inmune regulatoria mediante la expansión de células Treg mediada por 3-HK.<sup>160,161</sup> La inducción de IDO depende de la expresión de AhR y a su vez varios de sus metabolitos son ligandos de este receptor asociados a la inducción de células Treg.<sup>92,135,165</sup> Si bien KYN es un ligando considerado de afinidad intermedia, recientemente se ha descrito que subproductos de KYN generados de manera espontánea, denominados TEACOPs, tienen una capacidad de activación de 100 a 1000 veces mayor que el compuesto original.<sup>96</sup> Además, se ha reportado que la administración terapéutica del ligando de AhR 3-HK en ratones Balb/c infectados con *T. cruzi* es capaz de inducir células Treg y mejorar la patología cardíaca en esta cepa de ratones.<sup>161</sup>

En este trabajo de tesis se estudió el efecto de la infección con *T. cruzi* sobre la modulación de la expresión de AhR y de sus ligandos agonistas en dos cepas de ratones con diferente susceptibilidad a la patología inflamatoria. Además se investigó el rol que juega la señalización a través de este receptor en la regulación de la respuesta inmune inflamatoria característica de la enfermedad de Chagas y el desarrollo de memoria inmunológica. Finalmente, se analizó como la infección con *T. cruzi* modula la presencia de ligandos agonistas de AhR y de metabolitos del Trp en suero en pacientes infectados que cursan diferentes formas clínicas de la enfermedad y su posible uso como biomarcadores.

Al analizar la expresión de AhR en bazo de ratones NI se observó que los ratones B6 presentaban mayor expresión del receptor, tanto a nivel de proteína como de ARNm que los Balb/c. Además, se observó una disminución en la expresión del receptor en los ratones B6 y un aumento en los Balb/c durante la infección. La expresión de AhR puede ser regulada por diversos factores de transcripción entre ellos el receptor de glucocorticoides (GR).<sup>82,182</sup> Los glucocorticoides son hormonas producidas en respuesta al estrés que poseen capacidad inmunosupresora. En ensayos *in vitro* realizados en una

línea celular de hepatoma murino, se observó que la incubación con dexametasona (glucocorticoide sintético) favorece la transcripción de AhR mediante un mecanismo dependiente del GR y que el aumento en la expresión de AhR se encuentra asociado a una mayor capacidad de respuesta a sus ligandos. En concordancia, la extracción del hipotálamo en ratas lleva a una disminución en la expresión de AhR en el hígado de estos animales.<sup>182,183</sup> En cuanto a la producción de glucocorticoides durante la infección con *T. cruzi* Roggero y col. 2007 han reportado que en la primer semana de infección los niveles de corticosterona aumentan rápidamente en los ratones Balb/c mientras que en los B6 no se observan cambios significativos hasta la tercera semana de la infección,<sup>184</sup> lo cual podría explicar las diferentes cinéticas de expresión de AhR observadas entre los ratones Balb/c y B6. Además, en la infección con *T. cruzi* los glucocorticoides endógenos son necesarios para mantener el balance entre células T convencionales/Treg, por lo que el retraso en el aumento de corticosterona en los ratones B6 estaría asociado a la baja expresión de AhR y al desbalance entre células Tconvencionales y Treg observado en esta cepa de ratón.<sup>58</sup> Por otro lado, la expresión de la enzima hepática L-triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO), que media el paso inicial del catabolismo del Trp en el hígado, aumenta en respuesta a cortisol, lo que podría llevar al aumento de kinureninas circulantes.<sup>185</sup> Por lo que no solo las diferencias observadas en la actividad de la enzima IDO entre ratones Balb/c y B6 sino también un aumento en la actividad de TDO relacionada a la concentración de glucocorticoides sistémicos generados en la infección podrían constituir uno de los mecanismos por los cuales se observa una mayor concentración de KYN (Figura A1) y mayores niveles de ligandos agonistas de AhR totales en suero de ratones Balb/c respecto de B6 (Figura 2) en la etapa aguda de la infección.

Distintos estudios han puesto en evidencia que existe una correlación entre la presencia de polimorfismos genéticos y el desarrollo de patología.<sup>186</sup> En este sentido, reportes indican que ciertos polimorfismos funcionales de AhR se encuentran asociados con mayor riesgo de padecer enfermedades coronarias y al desarrollo de vitíligo.<sup>187,188</sup> Esto podría deberse a que ciertas variaciones en la estructura primaria de una proteína pueden repercutir en la manera en que interacciona con otras proteínas, ligandos o

secuencias de ADN, modificando el resultado de dicha interacción. En este sentido, se ha reportado que un cambio en un solo aminoácido en la región de unión a ligando vuelve a los ratones con el polimorfismo denominado AhRd menos susceptible a los efectos tóxicos de TCDD, requiriéndose concentraciones de un determinado ligando de 10 a 100 veces mayores a la normal para lograr una activación similar a la observada en otras cepas de ratones.<sup>163</sup> Para analizar cómo los polimorfismos de AhR presentes en las cepas Balb/c y B6 afectan la capacidad de respuesta a un ligando que genera una señal de activación de AhR fuerte persistente como TCDD, y a un ligando que produce una señalización más débil como ITE, se utilizaron macrófagos derivados de médula ósea de estos ratones. Se observó que tanto en presencia de ITE como de TCDD se induce una mayor transcripción de *Cyp1a1*, medida indirecta de la activación de AhR, en los macrófagos de los ratones Balb/c (*Ahr<sup>b1</sup>*) que en Mos de ratones B6. Además, se observó que las diferencias en polimorfismos entre estas cepas de ratón también influyen en la fuerza de activación de AhR por ligandos endógenos como ITE. Estos resultados concuerdan con diferentes reportes que indican que el alelo de AhR presente en los ratones Balb/c se activa con mayor intensidad que el de ratones B6 en presencia de partículas provenientes de la combustión, mezcla que contiene entre sus componentes orgánicos ligandos de AhR conocidos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y derivados de HAP.<sup>163,189</sup> Por otro lado, el tratamientos de los macrófagos con el lisado de *T. cruzi* aumentó la transcripción de *Cyp1a1* en ambas cepas de ratones, efecto que se demostró dependiente de AhR ya que el nivel de transcripción de *Cyp1a1* disminuye significativamente con el agregado del antagonista de AhR CH223191 a los cultivos (Figura 3A). A los fines de evaluar la presencia de ligandos de AhR en el extracto total de *T. cruzi*, se evaluó la capacidad de este lisado para activar AhR utilizando el ensayo de plásmidos reporteros. Se observó que este lisado fue incapaz de inducir actividad de luciferasa (no mostrado), lo que demuestra la ausencia de ligandos agonistas de AhR en un extracto de antígenos parasitarios y sugiere que el aumento en la expresión de *Cyp1a1* mediado por AhR observado en macrófagos (Figura 3), se debe a que el lisado induce la producción por el macrófago de ligandos agonistas endógenos de AhR. Sin embargo, este resultado no

invalida la existencia de moléculas generadas por el microorganismo vivo que puedan actuar como ligandos de AhR o modular indirectamente su actividad. En este sentido, mediante análisis de bases de datos de genes, se ha observado que existe un aumento de la enzima kinureninasa en la forma metacíclica infectiva de *T. cruzi* en relación a la epimastigote, que es capaz de clivar KYN y 3-HK para generar L-arginina y ácido antranílico o 3-hidroxiantranílico (3-HAA).<sup>190</sup> Si bien no se ha reportado que 3-HAA sea ligando de AhR su oxidación genera ácido cinabarino un metabolito que se sabe es capaz de activar al receptor.<sup>93</sup> Así mismo, se ha reportado que el 3-HAA induce la transcripción de AhR de mediante su unión al coactivador nuclear 7 (NCOA7), que se expresa en varios tipos celulares, entre ellos CD4 y Mo. Además, se ha asociado a 3-HAA con el aumento de IDO lo que podría favorecer la generación de metabolitos de la vía de las kinureninas generando más ligandos del Trp, que podrían ser luego clivados por la enzima del parásito llevando a la activación de AhR.<sup>191,192</sup> Por otro lado, el aumento de la enzima kinureninasa en la forma infectiva del parásito podría constituir un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedador a tiempos tempranos de la infección, para evitar su eliminación disminuyendo la concentración del metabolito tóxico 3-HK.<sup>41,160</sup> En este sentido se ha reportado también que 3-HAA es capaz de potenciar la capacidad inmunoregulatoria de CD4<sup>+</sup> IDO<sup>+</sup> aumentando su capacidad de supresión de células efectoras (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>).

Por otro lado, los polimorfismos en AhR no solo condicionan la afinidad de unión a ligandos, sino que también pueden afectar la disponibilidad del receptor mediante la alteración de procesos postraduccionales, entre ellos la fosforilación y ubiquitinación del receptor. Se ha reportado que la sustitución de la Ser-12 y 36, sitios de fosforilación de PKC adyacentes a los fragmentos que conforman “señal de localización nuclear” (NLS) de AhR, por ácido aspártico u otro aminoácido de carga negativa que simula la carga negativa de la fosforilación, inhibe la translocación de AhR al núcleo.<sup>167</sup> Al determinar el porcentaje de AhR presente en el núcleo de macrófagos derivados de peritoneo, se observó una mayor localización nuclear del receptor en macrófagos de ratones Balbc NI e INF respecto a los de B6. Teniendo en cuenta que el análisis de las secuencias de aminoácidos de AhR

de ratones Balb/c y B6 presente en la base de datos de secuencias protéicas del NCBI (National Center for Biotechnology Information) no mostró que existan sustituciones en la Ser-12 y 36 en ninguno de los receptores presentes en estas cepas, la mayor translocación de AhR al núcleo en células Balb/c podría estar relacionado con la mayor presencia de ligandos de AhR observada en los ratones Balb/c luego de la infección (Figura 2A y Figura 3). Por otro lado, la menor localización de AhR en el núcleo se asocia con la activación de los mecanismos que regulan la transcripción del receptor, favoreciendo su movilización al citoplasma y posterior destrucción en proteosomas. Por lo que la disminución de AhR en el núcleo que se observa a las 24 h pi en macrófagos de peritoneo de ratones B6 (Figura 4) y la rápida disminución de la expresión de AhR en esplenocitos que se evidencia desde el día 3 pi (Figura 1B y C) podría deberse a que el AhR expresado en ratones B6 presenta una mayor susceptibilidad a la ubiquitinación y posterior proteólisis que el expresado en Balb/c. Lo que llevaría a una disminución en la magnitud y duración de la regulación génica mediada por AhR debido a su menor tiempo de disponibilidad en el núcleo.<sup>193</sup>

La infección con *T. cruzi* modula de manera diferencial la expresión de AhR en estas cepas de ratón, así como también la generación de ligandos de AhR. Las diferencias observadas se encontrarían asociadas al componente genético del hospedador, entre estos, a los polimorfismos de AhR que determinan la magnitud de la respuesta del receptor frente a ligandos y su susceptibilidad a la regulación mediante modificaciones postraduccionales. La rápida disminución de AhR durante la infección observada en células de ratones B6, su menor capacidad de generar ligandos endógenos y de activar a AhR son factores que podrían contribuir a la menor capacidad para inducir células Treg y en general de controlar la respuesta inflamatoria observada en esta cepa de ratones luego de la infección con *T. cruzi*.

De manera interesante, al determinar la composición de metabolitos del Trp en los sueros de pacientes infectados y Control mediante LC-MS, se observó que la concentración sérica de KYN, primer metabolito del Trp generado por la actividad deIDO en la vía de las kinureninas, fue mayor en suero de pacientes infectados que en los de los

controles (Figura 28). Así, se ha demostrado que, tanto en humanos como en el modelo murino (Capítulo I), la concentración del ligando de AhR KYN aumenta en suero luego de la infección, hecho que se correlaciona con el incremento de la actividad deIDO que se observa en el modelo murino luego de la infección. Sin embargo, la actividad global de ligandos de AhR se encuentra disminuida en el suero de los pacientes infectados crónicos respecto de los controles y es similar a lo observado en ratones NI e infectados a partir del día 15 pi (Figura 2B). En conjunto, estos resultados sugieren que la menor actividad global de ligandos de AhR presentes en suero de individuos infectados se debe a un efecto de la infección sobre la producción de otros ligandos de AhR diferentes de KYN.

Además, al agrupar los pacientes con CCC de acuerdo con el grado de severidad de la patología cardíaca en Leve o Severa se observó que los pacientes con la forma Severa presentan significativamente mayores niveles de activación de AhR que los pacientes con la forma Leve. De manera similar a lo que se observa en sueros de individuos Control y pacientes infectados (CCC y IND) (Figura 24B), se ha reportado que en sueros de pacientes que presentan esclerosis múltiple remitente-recurrente (EMRR) el balance global de ligandos de AhR es menor que el del grupo control.<sup>194</sup> Además, y de forma análoga a lo observado comparando los niveles de agonistas en sueros de pacientes con CCC Severa y Leve, en las muestras de suero de pacientes con EMRR activa se detecta una mayor actividad global asociada a ligandos de AhR que en suero de individuos con EMRR en remisión, indicando una asociación entre mayor inflamación e incremento de la actividad agonista de AhR en ambas patologías.<sup>194</sup>

En relación con la mayor concentración de KYN acompañada de menor actividad agonista AhR observada en suero de pacientes infectados con *T. cruzi*, se podría considerar un efecto de la infección sobre vías metabólicas que controlan la producción y degradación de agonistas de AhR e hipotetizar la presencia de mayores niveles de algunos agonistas de AhR, diferentes de KYN, en sueros de pacientes Control vs INF. Así, el análisis de metabolitos del Trp por LC-MS reveló que tanto los niveles de ácido kinurénico como los de ácido xanturénico son menores en los sueros de pacientes INF en relación al grupo Control (Figura 28). Utilizando una línea celular de hepatoma humana que expresa de

manera estable un plásmido reportero que contiene un sitio DRE acoplado a luciferasa con una secuencia similar a la utilizada en este trabajo de tesis, se ha demostrado que tanto el ácido kinurénico como el xanturénico son capaces de activar el AhR humano.<sup>94</sup> Por lo que el aumento en la actividad agonista global de AhR observada en los sueros Control podría estar mediada en parte por la presencia de estos ligandos. Considerando que para el estudio de la abundancia de metabolitos en suero realizado mediante LC-MS se utilizó un enfoque de metabolómica dirigida, es decir se determinó la abundancia de metabolitos previamente identificados mediante la utilización de patrones, es importante destacar que la identificación de la presencia de ligandos de AhR entre el grupo Control vs el INF y su asociación con la disminución de la actividad agonista de AhR estuvo limitada a metabolitos conocidos. En este sentido, recientemente se ha reportado que metabolitos intermediarios generados a partir de KYN de manera espontánea actúan como ligandos de AhR de alta afinidad con una potencia de activación del receptor en el orden de pM (las concentraciones de KYN requeridas para activar AhR se encuentran en el orden del  $\mu\text{M}$ ).<sup>92,96</sup> Por lo que las diferencias observadas en la actividad global de AhR detectada en sueros se encuentra también influenciada por potenciales ligandos de AhR aún no identificados, que no se encuentran contemplados entre los metabolitos conocidos analizados o cuyas concentraciones se ubican por debajo del umbral de sensibilidad del método utilizado.

Si bien alrededor del 90% del Trp se degrada mediante la vía de las kinureninas, se observó que la infección no solo modificó los niveles en suero de los metabolitos asociados con esta vía metabólica, sino que también se detectaron cambios en los niveles en suero de metabolitos del Trp pertenecientes a las vías de la serotonina y la triptamina. Mediante ACP de los metabolitos del Trp se determinó que la expresión de los compuestos 5-hidroxitriptófano, serotonina, N-metil serotonina y triptamina contribuyen en mayor medida a las diferencias observadas entre el grupo Control y las muestras pertenecientes a todos los pacientes INF (Figura 27). Además, se observó un aumento significativo en los niveles de 5-hidroxitriptófano, serotonina, N-metil serotonina y triptamina en sueros INF respecto a los Control (Tabla 2). De estos compuestos, tanto

serotonina como triptamina son ligandos de AhR,<sup>95,109</sup> mientras que 5-hidroxitriptófano es un precursor de serotonina y N-metilserotonina el producto de la metilación de la misma. En concordancia, un estudio de metabolómica global realizado en suero y tejido cardíaco obtenidos de ratones Balb/c en la etapa aguda de la infección con la cepa Y de *T. cruzi* demostró que un tercio de los metabolitos presentes en plasma y dos tercios de los presentes en tejido cardíaco se expresan de manera significativamente diferencial en animales infectados y controles.<sup>176</sup>

El análisis diferencial de metabolitos que contribuyen en mayor medida a la separación de los sueros de pacientes con cardiopatía severa de los sueros de los demás grupos en el gráfico de CP reveló un aumento en los niveles de Trp, kinurenina, ácido quinolínico y N-acetilserotonina (Figura 27 y 29). Las diferencia más notable entre el grupo Severo y los demás grupos es la observada en N-acetil serotonina y Trp, cuyos niveles son alrededor de 4 y 2 veces mayor en el grupo severo que en los demás grupos (Control, IND, Leve). En concordancia, Girones y col.<sup>176</sup> reportaron un aumento de KYN en plasma y corazón de ratones infectados con la cepa Y de *T. cruzi* en el día 21 pi, tiempo en el que ya se observa patología cardíaca en ese modelo de infección. En este trabajo se reporta, además, un incremento en la concentración de Trp en tejido cardíaco, aunque no observan cambios en las concentraciones de este metabolito en suero. Si bien un aumento de Trp podría indicar acumulación del mismo debido a una menor actividad de IDO, el aumento observado en los metabolitos del Trp en el grupo severo no concuerda con esta idea. La presencia de Trp libre en plasma se encuentra regulado, entre otros factores, por la disponibilidad de albúmina y dado que se ha reportado que la inflamación reduce los niveles de albúminas mediante un aumento de la tasa fraccional de catabolización de la misma (FRC), el aumento de Trp en los sueros de pacientes severos podría deberse a un aumento del Trp libre debido a una disminución en la albúmina.<sup>195,196</sup>

En relación al metabolito N-acetyl serotonina o normelatonina, que se genera a partir de la serotonina y luego da lugar a la melatonina, se lo conoce principalmente por sus efectos antidepresivos y neuroprotectoras,<sup>197</sup> pero no existen aún reportes que lo asocien con efectos sobre la funcionalidad cardíaca. Sin embargo, se ha reportado que

tanto la actividad de serotonina como la de melatonina están asociadas con la función cardíaca. El aumento de serotonina se encuentra asociado entre otras cosas a hipertensión, mientras que la melatonina confiere resistencia al daño por reperfusión isquémica, protege contra la inflamación miocárdica inducida por hipoxia crónica intermitente y la fibrosis, entre otros efectos.<sup>198,199</sup> De manera interesante, aunque en los resultados obtenidos parece existir sólo una tendencia a la disminución de melatonina en suero de los pacientes a medida que incrementa la patología cardíaca, esta menor disponibilidad podría estar asociado a una menor generación de melatonina a partir de N-acetil serotonina.

En la actualidad no hay estudios de metabolómica que reporten los niveles de metabolitos del Trp mediante LC-MS en pacientes cursando la etapa crónica de la Enfermedad de Chagas. En este sentido, en esta tesis se ha demostrado que durante la infección crónica con *T.cruzi* existe una desregulación de los metabolitos de la vía del Trp que se refleja en la composición de metabolitos del suero, entre ellos los metabolitos de la vía de la serotonina, triptamina y KYN.

La modificación en el balance de metabolitos se encuentra asociada a la mayor o menor actividad de las enzimas involucradas. Luego de la degradación de Trp a KYN por IDO o TDO, existen dos ramas principales en la vía de las kinureninas, una mediada por kinurenina monooxigenasa (KMO) y kinureninasa (KYNU) que llevan a la formación de 3-HK, ácido 3-hidroxiantranílico y ácido quinolínico, y otra controlada por kinurenina amino transferasa (KAT), de la que existen 4 isoformas, que genera ácido kinurénico y ácido xanturénico.<sup>94,200</sup> Se ha observado que durante la infección disminuyen los ligandos ácido kinurénico y xanturénico. Si bien no se observan diferencias significativas entre cada uno de los grupos en los que se dividieron los pacientes infectados (IND, Leve, Severo) y el grupo Control, los valores de las medianas de los grupos IND, Leve y Severo tanto para ácido kinurénico como xanturénico fueron menores que las del grupo Control, es decir, que al menos 50% de los datos en los grupos IND, Leve y Severo poseen un valor menor que el 50% de los datos del grupo Control. Esta diferencia es evidente en el gráfico donde se muestran los valores de ácido kinurénico (Figura 28) y la falta de significancia

estadística podría estar asociada a la dispersión de los valores en las muestras, sobre todo en los grupos Leve y Severo donde el número de muestras es pequeño. Por otro lado, respecto a la rama de la vía controlada por KMO y KYN durante la infección, específicamente en el grupo de sueros de pacientes severos, se observan niveles significativamente mayores de ácido quinolínico en el grupo severo respecto a los otros grupos, y nuevamente, si bien las diferencias entre este grupo y el Control no fueron estadísticamente significativas, el 75% de los valores (valores sobre el percentil 25) de ácido quinolínico en sueros del grupo severo son mayores que el 50% de los valores en sueros Control (valores por debajo de la mediana), por lo que existiría una tendencia. Estas observaciones concuerdan con reportes que indican que KMO y KYNU son más susceptibles a la regulación por estímulos inflamatorios, aumentando su expresión en presencia de LPS, IFN- $\gamma$  e IL1- $\beta$ , mientras que la expresión de las isoformas KAT disminuye o no se ven afectadas en contextos inflamatorios.<sup>201</sup>

También se observaron alteraciones en la vía de la serotonina demostrando que en presencia de infección se favorece la generación de N-metil serotonina a partir de serotonina, mientras que en el grupo severo además aumenta N-acetil serotonina. Además, se identificó a N-acetil serotonina como potencial biomarcador de Severidad, aunque no se tienen datos si la presencia de este marcador es exclusivo de la cardiopatía chagásica o está también incrementado en cardiopatías de otros orígenes.

Las alteraciones en la expresión de metabolitos del Trp han sido asociadas a diversas patologías, entre ellas a la enfermedad inflamatoria intestinal, patologías que afectan al CNS (Huntington, Parkinson y Alzheimer), y a enfermedades cardiovasculares y a su mortalidad.<sup>200,202,203</sup> Por lo que la comprensión de los mecanismos que llevan a la desregulación de los niveles de metabolitos del Trp sería importante para el desarrollo de estrategias terapéuticas, como el diseño de inhibidores de la acción de enzimas de las vías de degradación del Trp, y la identificación de marcadores específicos de la enfermedad.<sup>204</sup>

Existen distintas estrategias que permiten manipular la respuesta inmune, potenciando o disminuyendo la acción de la población celular de interés. Con el objetivo

de favorecer la generación de una respuesta Treg en los ratones B6 infectados con *T. cruzi*, se utilizaron dos estrategias para la activación de AhR. Los resultados obtenidos luego de administrar TCDD a los ratones B6 indican que una activación fuerte de AhR durante la infección con *T. cruzi* es capaz de normalizar la relación Th1/Treg y Th17/Treg. Los resultados mostrados sugieren que la modificación del balance de la respuesta inflamatoria sería el resultado de un aumento en la muerte de las células activadas, el aumento de células Treg con capacidad para producir la citoquina inmunoregulatoria TGF- $\beta$  y la mayor resistencia observada en la población Treg a la apoptosis inducida por TCDD (Figuras 8 y 9). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la frecuencia y el número absoluto de células productoras de IL-10 en comparación a los ratones no tratados. El efecto tóxico de TCDD en células activadas ha sido previamente demostrado.<sup>171</sup> En este trabajo de tesis se reporta por primera vez que las células Treg son resistentes a la toxicidad mediada por TCDD y teniendo en cuenta que tanto las células Treg de humanas como murinas son más resistentes que las células T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> a la apoptosis inducida por otras causas como irradiación, interacción Fas-Fas ligando e infecciones virales,<sup>205-208</sup> no es sorprendente que estas células sean también resistentes a la activación de AhR por un ligando xenobiótico como TCDD. Respecto al efecto de TCDD sobre células T CD8<sup>+</sup>, Winans y col. han demostrado que TCDD induce en estas células un patrón de metilación similar al que presentan las células T CD8<sup>+</sup> exhaustas,<sup>209</sup> lo que sugiere que la activación fuerte con un agonista de AhR impacta tanto en la funcionalidad basal como en la respuesta a antígenos hecho que también podría explicar la disminución en la respuesta de memoria descrita en capítulo III. Si bien la activación fuerte de AhR mediante TCDD fue capaz de regular la inflamación en ratones B6 infectados, la inmunosupresión causada por TCDD contribuyó al aumento de la replicación parasitaria, por lo que el resultado final del tratamiento fue una mayor susceptibilidad a la infección en estos ratones que mostraron mayores parasitemias, mayor expresión en suero de enzimas indicadoras de daño hepático y menor sobrevivencia (Figuras 5A y B). Así, la activación de AhR con este ligando durante la etapa de inducción de la respuesta inmune no sería recomendable, ya que no permitiría el desarrollo de una respuesta inmune

protectora adecuada para eliminar al microorganismo. Sin embargo, la activación con TCDD luego de la fase de inducción de la respuesta específica tampoco fue efectiva para incrementar la resistencia a la inflamación en esta cepa de ratones, ya que si bien se produjo un retraso en el pico de la parasitemia, los parásitos en sangre incrementan más tardíamente y el tratamiento resultó en la muerte de los ratones tratados con TCDD (Figura 10).

La otra estrategia utilizada para inducir células Treg en los ratones B6 fue administración de los ligandos endógenos de AhR, 3-HK e ITE con la idea de activar AhR (ITE, 3-HK) y al mismo tiempo inhibir la replicación del parásito (3-HK).<sup>92,99,161,210</sup> Al igual que lo observado en el tratamiento con TCDD, este tratamiento fue capaz de inducir células Treg y mejorar el desbalance entre células CD4+ CD25- y Treg durante la fase crónica de la infección. Sin embargo, la inducción de células Treg en conjunto con la limitada eficacia de 3-HK para eliminar completamente a los parásitos,<sup>160</sup> resultó en el desarrollo de una respuesta protectora deficiente incapaz de controlar la carga parasitaria en los tejidos en los ratones tratados con ITE + 3-HK en relación al Control. Así, el aumento en la carga parasitaria en los ratones tratados se correlacionó con una menor producción de IFN- $\gamma$  y TNF (citoquinas protectoras asociadas al control de la replicación parasitaria)<sup>211</sup> y una mayor producción de IL-10 (incrementa la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*)<sup>211</sup> por los esplenocitos de los ratones tratados con 3-HK+ITE durante la fase aguda de la infección.

En conclusión, los resultados obtenidos mediante la utilización de dos estrategias experimentales para promover el desarrollo de células Treg mediante la activación de AhR demostraron que el incremento en el número de células Treg no fue capaz de disminuir la inmunopatología; en este sentido, reportes recientes indican que durante la infección con *T. cruzi* se necesita una respuesta de células Treg limitada para permitir el desarrollo de la respuesta de células T específicas contra el parásito.<sup>57,60</sup> La disminución de la resistencia a diversos patógenos ha sido reportada cuando la exposición a TCDD ocurre tanto antes como después de la infección; sin embargo, si la activación de AhR contribuye a mejorar o empeorar la resistencia del hospedador depende del tipo de patógeno.<sup>150,212,213</sup> Así,

contrariamente a lo observado en la infección con *T. cruzi*, la activación de AhR en la infección con *Leishmania major* disminuye la carga parasitaria.<sup>154,214</sup>

Se ha reportado que la activación de AhR bajo condiciones polarizantes Tr1 (IL-27 o TGF- $\beta$ +IL-27) promueve la diferenciación de esta población celular (CD4+ IL-10+). Sin embargo, a pesar que se observó un incremento en la producción de TGF- $\beta$  en ambos tratamientos y que se ha demostrado que durante la infección de ratones B6 con *T. cruzi* cepa Tulahuen se incrementa la producción de IL-27<sup>58</sup>, ninguno de los tratamientos ensayados para activar AhR incrementó de manera significativa la población Tr1.

Mediante la utilización de ratones AhR<sup>-/-</sup> (KO), Barroso y col.<sup>215</sup> han examinado el rol de AhR en la modulación de la respuesta inmune y el desarrollo de miocarditis durante la infección con *T. cruzi*, y algunos de los resultados reportados en su trabajo se correlacionan con lo que observamos en los ratones AhRd. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los ratones AhR KO son menos susceptibles a la mayoría de los efectos tóxicos de TCDD y exhiben múltiples anomalías fisiológicas que son independientes de la exposición a xenobióticos.<sup>216</sup> El hecho de que los ratones AhR KO presentan un desarrollo anormal del sistema inmune y del hígado debe ser considerado cuando se quiere estudiar el rol de la activación de este receptor en la modulación de la respuesta inmune y el desarrollo de patología hepática, al tratarse de un modelo en el que el principal blanco de la infección es el hígado y no el corazón como se observa en humanos infectados y en ratones Balb/c.<sup>174</sup> Por esta razón, en este trabajo de tesis se decidió evaluar el rol de la activación AhR por ligandos de endógenos generados durante la infección con *T. cruzi* (por ejemplo los metabolitos del Trp), mediante la utilización de ratones B6-AhRd. El alelo AhR presente en los ratones congénicos AhRd tiene una afinidad 10 veces menor a TCDD por lo que requiere una dosis 10 veces mayor de TCDD que los ratones con el alelo *Ahr*<sup>b1</sup>, presente en los ratones B6 WT para lograr efectos similares.<sup>163</sup> Se observó que los ratones AhRd sufren una disminución más pronunciada de la población Treg que los ratones WT, lo que es consistente con el rol de la activación AhR en la inducción de células Treg.<sup>92,117</sup> Como se esperaba, menores niveles de células Treg correlacionaron con una fuerte respuesta Th1 capaz de controlar la carga parasitaria

durante la etapa aguda y crónica de la infección. Sin embargo, los ratones AhRd infectados no desarrollaron daño hepático asociado a la respuesta Th1. Al analizar la cinética de la respuesta Th1, se observó que ratones AhRd desarrollan entre los días 10 y 17 pi un mecanismo de regulación de la respuesta Th1 independiente de las células Treg. Al día 10 pi los niveles de IL-10 en suero como así también la expresión de IL-10 de células CD4+ en bazo aumenta de manera significativa en los ratones AhRd en relación al WT. En concordancia, Barroso y col.<sup>215</sup> reportaron menor parasitemia y patología cardíaca con mayor expresión de células productoras de IFN- $\gamma$  en bazo durante la fase aguda de las infección de ratones AhR KO infectados con la cepa Y de *T. cruzi*, mientras que también reportan un aumento en la población de células CD4+ IL-10+ y no observan diferencias significativas en la población de células Treg en ratones KO vs los WT.<sup>215</sup> De similar manera, Brant y col.<sup>217</sup> han reportado un aumento de células CD4+ IL-10+ en hígado y de IL-10 en suero de ratones AhR KO infectados con *Plasmodium berghei* Anka. Teniendo en cuenta que la adquisición del fenotipo Tr1 depende fuertemente de la señalización de AhR<sup>218</sup> que es muy débil en los ratones AhRd, es muy improbable que la población CD4+ productora de IL-10 que se encuentra aumentada en los ratones AhRd infectados sea una población Tr1. La producción de IL-10 por células T efectoras es un mecanismo de regulación negativa esencial en respuesta muchas infecciones<sup>219–222</sup> y la relación entre la IL-10 y el IFN- $\gamma$  producido por células Th1 podría influenciar el balance entre la eliminación, la persistencia crónica o la inmunopatología.<sup>223,224</sup> Se ha demostrado que las células Th1 productoras de IL-10, también llamadas Th1 auto regulatorias, se activan de manera temprana en un ambiente altamente inflamatorio mediante activación repetida del TCR (y alta dosis de antígeno) y la acción continua de IL-12.<sup>225</sup> Debido a que las células Th1 activadas expresan niveles muy bajos de AhR, es muy poco probable que puedan ser moduladas de manera directa por ligandos de AhR. Por otro lado, teniendo en cuenta que las CD4 expresan este receptor constitutivamente y su activación induce propiedades tolerogénicas en estas células reduciendo la producción de citoquinas proinflamatorias,<sup>99,133</sup> la falta de señalización AhR podría inducir en CD4 una hiperactivación que lleve a la expresión de señales que promueven la producción de IL-10

por las células Th1. De acuerdo con esta idea, se ha reportado que cultivos de esplenocitos de ratones AhR KO infectados con *T. cruzi* o inmunizados con OVA producen mayores niveles de IL-12 que los controles,<sup>215,226</sup> como así también, en el modelo de infección en ratones AhRd desarrollado en esta tesis se ha observado mayor producción de IL-12 en cultivo de esplenocitos de ratones AhRd infectados vs WT (resultados no mostrados).

Pocos estudios han examinado el efecto de la señalización AhR en la adquisición de memoria inmunológica, pero distintos estudios epidemiológicos muestran que la exposición a dioxinas y PCBs lleva a la generación de una respuesta inmune más débil frente a la vacunación.<sup>145-147</sup> En concordancia, nuestros resultados demuestran que la activación fuerte de AhR afecta de manera negativa el desarrollo de las distintas subpoblaciones de memoria, dado que la administración de una única dosis de TCDD antes de la infección con *T. cruzi* disminuye la respuesta celular específica y previene la acumulación de células de memoria mediante un mecanismo que involucra la muerte de células activadas. De manera similar, en un modelo de infección primaria con el virus Influenza se observó una disminución de la respuesta de memoria luego de la activación de AhR.<sup>148,175</sup> No obstante, cuando se administra TCDD luego de establecida la respuesta de memoria, la magnitud de la respuesta CD8+ generada luego del reencuentro con el antígeno no se ve afectada, lo que sugiere que la activación de AhR modula eventos críticos para la activación de las células T vírgenes en la fase de inducción de las células de memoria.<sup>148,175</sup> Sin embargo, no se encontraron reportes sobre el efecto de la activación de AhR con ligandos distintos a TCDD sobre el desarrollo de subpoblaciones de memoria. Debido a que las células activadas sufren los efectos directos de la toxicidad de TCDD, en el modelo de activación con este xenobiótico no se puede concluir en relación a los efectos de la activación de AhR sobre el desarrollo de las distintas subpoblaciones de memoria. Por lo que para estudiar el desarrollo de las subpoblaciones T CD8+ de memoria en la infección se recurrió al modelo de tratamiento con agonistas débiles de AhR (3-HK+ITE) y a la infección en ratones AhRd. La activación de AhR con 3-HK+ITE disminuyó el porcentaje total de células T CD8+ esplénicas específicas que adquieren el fenotipo de ME

y MC, mientras que la señalización débil o falta de señalización de los ratones AhRd mostró resultados opuestos. Además, durante la fase crónica de la infección, los ratones AhRd se presentaron un aumento significativo de la expresión del receptor para IL-7 (CD127), un marcador de células de memoria de larga vida que permite su proliferación mediante unión a esta citoquina homeostática.<sup>227</sup> Estos resultados sugieren que la activación de AhR restringe la diferenciación de las células CD8+ de memoria. Al igual que en otras infecciones persistentes, durante la infección con *T. cruzi* las células T CD8+ se mantienen principalmente por la presencia de antígeno y presentan el fenotipo de ME sobre el de MC.<sup>49</sup> De manera interesante, a pesar de presentar mayor carga parasitaria que los control, los ratones tratados con 3-HK+ITE presentaron un menor número de células de ME dando cuenta del rol de la activación de AhR en la restricción del desarrollo de la respuesta de memoria.

Distintos estudios sugieren que, al igual que lo que ocurre en células Th1, el efecto de agonistas sobre la población T CD8+ es indirecto y mediado por el efecto de estos sobre CDs.<sup>165,175</sup> La baja expresión de AhR en la mayoría de las poblaciones T CD8+ apoya la noción de que la regulación de las células CD8+ por la señalización de AhR ocurriría de manera indirecta. Por lo que serían las CDs la principal población capaz de sensor y secretar ligandos de AhR durante la infección con *T. cruzi*, y la falta de señalización, la señalización débil y fuerte del AhR por agonistas en estas células podría modular su estado de activación, induciendo tanto efectos proinflamatorios como tolerogénicos sobre las células T y modulando el desarrollo de subpoblaciones celulares de memoria.<sup>92,135,165,228</sup> Además, el concepto de que un determinado ligando de AhR indefectiblemente generará una respuesta inmune particular ha comenzado a ser cuestionado y reformulado. Se ha comenzado a desarrollar y probar la idea de que es la fuerza de activación de AhR y no necesariamente la naturaleza del ligando que se une al receptor lo que determina la respuesta generada.<sup>124</sup>

Teniendo esto en consideración, nuestros resultados nos permiten proponer un modelo en el que existe un umbral de activación de AhR (ratones B6 WT). Señales por encima del umbral inducirían propiedades tolerogénicas sobre las CDs,<sup>99,133</sup> restringiendo

el desarrollo de células T CD8+ de memoria y promoviendo el de células Treg (como se observó en los tratamientos con TCDD y 3-HK+ITE) capaces de controlar de manera prematura la respuesta Th1. Por el contrario, señales por debajo de este umbral promoverían el desarrollo de una respuesta Th1 temprana capaz de restringir la replicación parasitaria y que es capaz de contraerse en el momento adecuado mediante la producción de IL-10. De esta manera, AhR es capaz de inducir distintas vías regulatorias que finalmente impactan sobre la replicación del parásito y el resultado final de la infección.

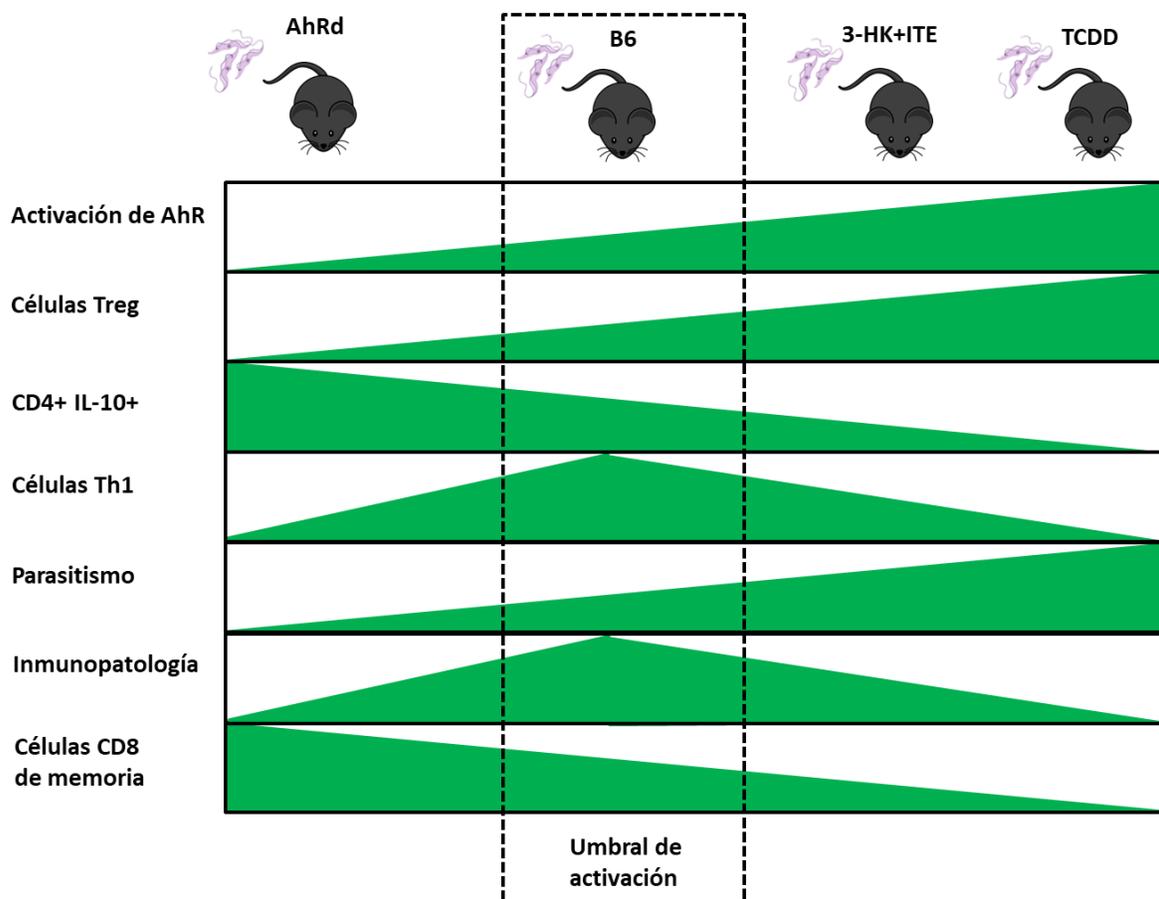


Figura 30. Modelo del efecto de la señalización AhR sobre la respuesta inmune protectora y patogénica durante la infección con *T. cruzi*. Los ratones B6 expresan un alelo de AhR con baja afinidad a ligandos endógenos por lo que su respuesta a los ligandos generados durante la infección se encuentra disminuida y son incapaces de generar las señales tolerogénicas necesaria para expandir la población de células Treg. La intervención terapéutica mediante ligandos de AhR activa al receptor sobre un determinado umbral que lleva a la generación de células Treg y control de la inmunopatología. Señales por debajo del umbral no inducen célula Treg pero sí una población de células CD4+ productoras de IL-10 capaces de controlar la respuesta Th1.

# MATERIALES Y MÉTODOS



## Animales de experimentación

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis se utilizaron ratones C57BL/6 (Wild Type), Balb/c y B6.D2N-Ahrd/J (AhRd). Se utilizaron animales hembra de 8-10 semanas de edad. En cada tiempo analizado se utilizaron de 3-6 ratones por grupo, mientras que para los análisis de sobrevivencia, parasitemia y evaluación del peso corporal se utilizaron grupos de 6-9 animales por grupo.

**C57BL/6 (B6) y Balb/c:** estos ratones expresan los alelos del receptor para aril hidrocarburos  $Ahr^{b1}$  y  $Ahr^{b2}$ , respectivamente. Estos alelos se caracterizan por presentar una buena respuesta al xenobiótico TCDD, ligando del receptor. Los animales fueron obtenidos de la Comisión Nacional de Energía Atómica (Buenos Aires, Argentina), reproducidos y mantenidos en el bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica-CIBICI.

**B6.D2N-Ahr<sup>d</sup>/J:** son animales congénicos de trasfondo genético B6 y que presentan un alelo de AhR caracterizado como de baja respuesta al ligando TCDD, denominado AhR<sup>d</sup> el cual deriva de la cepa de ratones DBA/2. Fueron gentilmente cedidos por el Dr. Francisco Quintana del Ann Romney Center for neurologic diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA.

Los animales de experimentación se mantuvieron de acuerdo con lo establecido por el Comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Res 831/15 y Res 720/18) que además otorgó la acreditación para el manejo de animales de experimentación de Categoría B (Res 723/18).

## Clasificación de sueros de pacientes infectados

Se incluyeron en el estudio Individuos de entre 21 a 68 años de edad, infectados con *T. cruzi* y atendidos en la Cátedra de Patología Médica I de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. La infección se confirmó mediante pruebas diagnósticas de rutina (ELISA, hemaglutinación e inmunofluorescencia), requiriéndose de dos pruebas positivas para considerar confirmada la infección. Se realizó además hemograma, radiografía de torax (RX) y ecocardiograma (ECG) en las 12 derivaciones convencionales. En base a estos estudios, los pacientes se agruparon en las siguientes categorías: Asintomáticos o Indeterminados (IND), los que presenten serología positiva con RX y ECG normales; y pacientes con Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC), aquellos con serología positiva y alteraciones en la RX y/o ECG. Además, los CCC se dividieron en Leves, presentaron alteraciones en el ECG, pero no presenten insuficiencia cardíaca congestiva, bloqueo de rama derecho completo u incompleto, arritmia ventricular o una relación cardiorádica  $< 0.55$  determinada mediante RX; y en Severos los que presenten insuficiencia cardíaca congestiva, trazas patológicas en el ECG y una relación cardiorádica  $> 0.55$ .

Los criterios de exclusión comprendieron enfermedades inmunológicas, tratamiento con hormonas o inmunomoduladores, o alteraciones genéticas conocidas. Ninguno de los pacientes se encontraba bajo tratamiento específico (benznidazol o nifurtimox) o presentó patologías concomitantes.

Los participantes expresaran por escrito su consentimiento informado. El proyecto fue aprobado por la Comisión de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario (Res. 666/2015).

## Reactivos

### **Reactivos utilizados en cultivo celular**

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo de tesis fueron: RPMI 1640 con rojo fenol (Thermofisher, EEUU), RPMI 1640 sin rojo fenol y DMEM (Corning, EEUU). Para suplementar los medios de cultivo se utilizó suero fetal bovino (SFB) de Natocor (Córdoba, Argentina), Glutamax (Gibco, EEUU) y gentamicina (Fabra, Argentina).

### **Reactivos utilizados en citometría de Flujo**

Las soluciones tampón para la determinación intranuclear del factor de transcripción Foxp3, "Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set" fueron adquiridos en la empresa Thermofisher (EEUU). La solución tampón para la fijación en la detección de citoquinas, los inhibidores del transporte de proteínas Golgi Stop (monensina) y GolgiPlug (Brefeldina A) y el kit de detección de apoptosis son de BD Bioscience (EEUU). Los estimuladores policlonales PMA y Ionomicina son de Sigma-Aldrich (Argentina).

### **Reactivos utilizados en la determinación de citoquinas por ELISA sandwich.**

Los ensayos fueron realizados en placas de 96 wells marca Costar (EEUU) de ½ área. Los anticuerpos de captura y biotinilados, como así también las proteínas recombinantes utilizadas como testigo fueron adquiridas en Thermofisher (EEUU). Para el revelado de la reacción se empleó estreptavidina unida con peroxidasa (Thermofisher, EEUU) y el sustrato TMB de dos componentes de BD Bioscience (EEUU) y ácido sulfúrico Ciccarelli (Argentina).

## **Western Blot**

El buffer de lisis RIPA para la obtención del lisado de proteínas celulares totales y las soluciones tampón para transferencia y lavado fueron preparados utilizando reactivos de alta calidad siguiendo el protocolo de Current Protocols in Immunology (Wiley). Los inhibidores de proteasas y la albúmina sérica bovina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Argentina. Se utilizaron los anticuerpos anti actina de Abcam y anti AhR de Enzo life science.

## **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para la extracción de ARN y ADN se utilizó TriReagent de Sigma-Aldrich (EEUU), agua ultra pura de Invitrogen (Thermofisher, EEUU). El alcohol absoluto, cloroformo e isopropanol utilizados de calidad biología molecular fue J.T. Backer Chemicals (EEUU).

El Buffer 5X M-MLV y la enzima M-MLV fueron adquiridos en Promega (EEUU) y Oligo d(T) y dNTP en Biodynamics (Argentina). La mezcla de reacción “Power SYBR Green Master Mix” utilizada en RT-qPCR y la utilizada en el sistema de detección Taqman “TaqMan™ Universal PCR Master Mix” son de Applied Biosystems (Thermofisher, EEUU).

Los cebadores utilizados fueron sintetizados por Invitrogen (Thermofisher, EEUU).

## **Ligandos de AhR**

El reactivo 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-dioxin (TCDD) se adquirió en Accustandard (Australia). Se utilizó ITE y CH223191 de TOCRIS (R&D, EEUU), L-Kyn y 3-HK de Sigma-Aldrich (EEUU).

## Infección experimental con *T. cruzi*

### **Mantenimiento de *T. cruzi in vivo***

El parásito *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuen) fue mantenido mediante pasajes periódicos en ratones Balb/c. Ratones macho de 6 a 10 semanas de edad fueron inyectados vía intraperitoneal con  $1 \times 10^6$  Tps. Al día 11 pi los animales fueron sangrados a blanco por vía retro orbital con pipeta Pasteur de vidrio heparinizada. La concentración de Tps en sangre fue determinada por conteo en cámara Neubauer luego del lisado de los glóbulos rojos con buffer de lisis ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,87%). Estos Tps se utilizaron para infectar nuevos ratones para el mantenimiento de la cepa o para la realización de los diferentes modelos experimentales.

### **Parasitemia**

Para determinar la parasitemia a distintos tiempos pi se extrajo sangre mediante sangrado de la cola del ratón. Para la extracción se colocó al animal en un dispositivo de inmovilización adecuado y mediante un pequeño corte en la cola se obtuvieron 30-40 $\mu\text{l}$  de sangre. La concentración de Tps en sangre se determinó como se indica en el inciso anterior.

### **Obtención y mantenimiento de *T. cruzi* para ensayos *in vitro***

En condiciones de esterilidad y mediante punción retro orbital se extrajo sangre de ratones Balb/c infectados. La sangre se dejó reposar en estufa de cultivo durante 2 h para luego de ese tiempo recolectar el plasma conteniendo los Tps. Los parásitos se utilizaron para infectar células Vero que han sido cultivadas en placas de Petri al 70% de confluencia. 48 h después, las células fueron lavadas con PBS para eliminar los Tps que no han ingresado a las células. Aproximadamente después de 6 días, los parásitos que se han

replicado en forma intracelular como amastigotes, pasan a la forma Tps y lisan las células pasando al medio de cultivo. Los Tps fueron obtenidos del sobrenadante de cultivo luego de centrifugar 7 min a 4400 rpm.

Los parásitos fueron utilizados para infectar MDMO y macrófagos obtenidos de peritoneo, generar lisado total de *T. cruzi* o fueron congelados a -80 °C con 90% SFB y 10% DMSO para utilizar en nuevas infecciones de células Vero.

### **Obtención de lisado total de *T. cruzi***

Tps obtenidos *in vitro* fueron sonicados por 1 min a 4°C. La concentración de proteína en el lisado se cuantificó mediante la técnica de Bradford.

### **Modelos experimentales *in vivo***

Los ratones fueron infectados por vía intraperitoneal con 50000 Tps de la cepa Tulahuen de *T. cruzi*.

### **Modelo de activación de AhR con el xenobiótico TCDD**

Se administró 40 ug/kg de TCDD diluido en DMSO mediante una inyección ip 24 horas antes de la infección con *T. cruzi*. El grupo control recibió una inyección ip de DMSO diluido en igual forma que el TCDD. Además, para comprobar si algún posible efecto tóxico observado se debía a una característica directa del tóxico sobre los animales de experimentación, un grupo de ratones recibió TCDD pero no fue infectado.

En otros experimentos los ratones fueron inyectados con TCDD o DMSO luego de 7 días pi.

### **Modelo de activación de AhR con 3HK e ITE**

El esquema de administración consistió en la inyección por vía ip de seis dosis de 3-HK (1 mg/Kg/dosis) del día 5 al 10 pi, y tres de ITE (200 ug) diluido en PBS en los días 7, 9 y 11 pi. El grupo Control fue inyectado con PBS en los días del 5 al 10 pi y con DMSO diluido en PBS en los días 7, 9 y 11 pi.

### **Modelo de infección en ratones congénicos AhR<sup>d</sup>**

Ratones AhR<sup>d</sup> y C57BL/6 (WT) fueron infectados con 50000 Tps de la cepa de *T. cruzi* vía ip.

### Obtención de plasma y suspensión de células de bazo de ratones

#### **Obtención de plasma**

La obtención de plasma de ratones para el ensayo de plásmidos reporteros se realizó mediante centrifugado por 5 min a 3000 rpm de sangre total obtenida como se indicó anteriormente.

La obtención de plasma de pacientes infectados crónicos y controles se realizó mediante centrifugado durante 5 min a 3000 rpm de la sangre entera obtenida en heparina por punción venosa. Las muestras fueron congeladas a -80°C hasta su utilización.

#### **Obtención de esplenocitos totales**

Una vez extraído el bazo se disgregó mecánicamente con émbolo en malla metálica utilizando PBS, se recogió en tubos de 15 ml y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min. Luego de descartar el sobrenadante se lisaron los glóbulos rojos con 1-2 ml de tampón de lisis, deteniendo la lisis por el agregado de 5 ml de PBS-SFB 2%. Luego de dos

lavados, las células fueron resuspendidas en 5-10 ml de RPMI completo y se determinó el número de células viables mediante conteo en cámara de Neubauer con azul de tripan.

### Caracterización de poblaciones celulares mediante citometría de flujo

La determinación de los porcentajes y números absolutos de distintas poblaciones celulares de bazo de los animales de los diferentes grupos experimentales fue realizado mediante citometría de flujo.

#### **Expresión de moléculas de superficie**

La preparación de las muestras para citometría de flujo fue en placa de 96 pocillos con fondo en U (Corning, EEUU) utilizando  $1 \times 10^6$  células por pocillo. Luego de lavar las células con PBS 2% SFB, se resuspendieron en 20  $\mu$ l de PBS 2% SFB con la mezcla de anticuerpos de superficie correspondiente. Luego de 20 min de incubación a 4°C, las células fueron lavadas con PBS 2% SFB, centrifugadas durante 5 min a 2000 rpm a 4°C y resuspendidas en PBS 2% SFB en tubos de citometría.

Para estudiar las células CD8+ específicas para el péptido TSKB20, se procedió de la manera antes descrita realizando una primera incubación con el tetrámero marcado con fluorocromo. Luego de lavar las células se incubó con la mezcla de anticuerpos de superficie adecuado para la determinación a realizar, como se indicó anteriormente.

#### **Expresión del factor de transcripción Foxp3**

Una vez realizada la tinción de superficie se agregaron, las células fueron fijadas con 100  $\mu$ l solución tampón de fijación por pocillo. Luego de incubar durante 30 min a 4°C, las células fueron lavadas con la solución tampón "Perm/Wash" y centrifugadas por 8 min a 2200 rpm y 10°C. Posteriormente las células fueron incubadas con 50  $\mu$ l del anticuerpo anti-Foxp3 diluído en "Perm/Wash" por 30 min a temperatura ambiente, lavadas con

solución tampón de lavado y resuspendidas en 100 µl de PBS 2% SFB en tubos de citometría.

Las soluciones de lavado y de fijación son parte del kit “Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set” de Thermofisher (EEUU).

### **Determinación de células productoras de citoquinas**

La estimulación de las muestras para la determinación de citoquinas por citometría de flujo se realizó en placa de cultivo estéril de 96 pocillos con fondo en U (Corning, EEUU) utilizando  $2 \times 10^6$  células por pocillo en 100 µl de suspensión. Las células fueron activadas por incubación con 100 µl de medio RPMI completo (10% SFB, Glutamax, Gentamicina 40µg/ml) conteniendo los estímulos policlonales PMA (0,1 µg/ml) y Ionomicina (0,5 µg/ml) o lisado completo de *T.cruzi* (10 µg/ml) en presencia de Golgi Stop (Brefeldina A) y Golgi Plug (Monensina) (para detener el tráfico vesicular y favorecer la acumulación de citoquinas en la célula para su posterior detección) por 4 h a 37°C en una atmósfera constante de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS 2% SFB y centrifugadas durante 5 min a 2000 rpm y 4°C. Luego de marcar las moléculas de superficie como se indicó en el apartado “expresión de moléculas de superficie”, las células fueron fijadas con la solución tampón “Cytfix/Cytoperm” (BD Bioscience) durante 20 min a 4°C, lavadas con el tampón de lavado “Perm/Wash” (BD Bioscience) e incubadas con 20 µl de anticuerpos anti-citoquinas diluidos en solución “Perm/Wash”. Luego de 20 min de incubación a 4°C, las células fueron lavadas y resuspendidas en PBS 2% SFB en tubos de citometría.

La producción de TGF-β se determinó de manera indirecta mediante la cuantificación de la expresión de LAP (Péptido de latencia asociado) que se encuentra asociado a la producción de esta citoquina. Para ello las células fueron estimuladas con PMA/Ionomicina (0,1 µg/ml/0,5 µg/ml) en ausencia de Brefeldina y Monensina. La determinación de LAP se realizó utilizando el anticuerpo específico marcado con fluorocromo como una determinación para moléculas de superficie.

## Lineas celulares y cultivos primarios

### **Cultivo primario de esplenocitos**

Los esplenocitos obtenidos en experimentos *in vivo* fueron cultivados en placas de 24 pocillos en presencia de lisado total de *T. cruzi* (10 µg/ml) o de medio RPMI completo. Luego de 72 h de incubación en atmósfera constante con 5 % de CO<sub>2</sub> y a 37°C, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C.

### **Líneas celulares**

- **L929:** esta línea celular deriva de tejido conectivo de ratones C3H/An y es capaz de producir y liberar al medio factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (CSF-1). El medio condicionado se utilizó para la obtención de macrófagos derivados de médula ósea (MDMO).

- **VERO:** línea procedente de riñón de mono. Se utilizaron como célula huésped para la obtención de Tps de *T. cruzi*. Se las cultivó con RPMI 1640 completo.

- **HEK293:** esta línea se origina de células de riñón de embrión humano. Se utilizó para los ensayos de transfección con plásmido reportero en las determinaciones realizadas en plasma de pacientes y controles sanos.

- **4T1:** esta línea celular de origen murino se utilizó en los ensayos de transfección con plásmido reportero para analizar muestras provenientes de ratones. Es una línea celular desarrollada a partir de un carcinoma mamario de ratón Balb/c.

## Obtención de macrófagos y tratamientos

### **Obtención de macrófagos de peritoneo (MP)**

Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical y posteriormente, en condiciones de esterilidad, se realizó una pequeña incisión a la altura del abdomen para separar la piel. La población de células peritoneales se obtuvo mediante lavado de la cavidad peritoneal con PBS estéril. Una vez lisados los glóbulos rojos y lavadas las células con PBS, se las resuspendió en medio de cultivo RPMI completo.

### **Obtención de macrófagos derivados de médula ósea**

La médula ósea fue obtenida de las extremidades posteriores y anteriores de los ratones. A los fines de realizar la diferenciación a macrófagos,  $10 \times 10^6$  células fueron colocadas en el centro de una placa de Petri con 10ml de medio RPMI completo, suplementado con un 16% de medio condicionado conteniendo el factor CSF-1. Al tercer día de cultivo, 5ml del medio fue reemplazado por 5 ml nuevos de RPMI completo conteniendo CSF-1. Luego de 6 días de cultivo los macrófagos (MDMO) fueron obtenidos utilizando PBS frío, contados y colocados en placas de acuerdo con el protocolo de experimentación.

## Determinación de la traslocación de AhR al núcleo celular

MP obtenidos de ratones a las 24 h pi fueron incubados en placas de 24 pocillos conteniendo cubreobjetos circulares durante 2 h en estufa de cultivo (5 % de CO<sub>2</sub>, 37°C) para permitir que se adhieran. Luego de lavar los pocillos con PBS para eliminar las células no adheridas, las células fueron fijadas con 250 µl de PBS-Formol 4% a temperatura ambiente durante 40 min. Luego de lavar con PBS, las células fueron permeabilizadas con

250 µl de una solución PBS-Tritón 1% por 15 min a temperatura ambiente. Luego de lavar con PBS, se agregó PBS-Albúmina 1% como solución de bloqueo por 15 min a temperatura ambiente. El anticuerpo contra AhR se agregó en 100 µl diluido en solución de bloqueo (1/200) y se incubó overnight a 4°C. Posteriormente, los MP fueron lavados con PBS e incubados con anti-IgG de conejo conjugado con FITC, diluido en solución de bloqueo durante 1 h. Luego del lavado con PBS se agregaron 100 µl de DAPI durante 10 min para colorear el núcleo celular. Luego del lavado, los cubreobjetos conteniendo las muestras fueron montados utilizando líquido de montaje Fluorsave. Los preparados se visualizaron mediante microscopía confocal de exploración por láser en el microscopio Olympus FV1000 con un aumento final de 1200X. Los análisis de imágenes se realizaron con el programa Fiji/ImageJ, empleando el método de análisis de colocación de Mander's. La cuantificación de fluorescencia en el núcleo se realizó mediante el programa Image J.

#### Cuantificación de Citoquinas mediante ELISA sandwich

La cuantificación de citoquinas en suero y sobrenadante de cultivos se realizó mediante la técnica de ELISA sándwich utilizando anticuerpos específicos de captura sin marcar y de revelado marcados con biotina siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Los ensayos fueron realizados en placas de 96 pocillos de ½ área utilizando 25 µl de solución de anticuerpos de captura (en PBS) , 80 µl de solución de bloqueo (PBS-5% Tween 20 o PBS-Albúmina 1% solo para la determinación de TGF-β), 25 µl de las muestras convenientemente diluidas en solución de bloqueo o los correspondientes testigos, 25 µl de anticuerpo anti-citoquina marcado con biotina, 25 µl de estreptavidina-HRP, 40 µl de sustrato TMB y se detuvo la reacción con 40 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 parte de ácido y 9 partes de agua). Los lavados entre pasos fueron realizados con PBS-5% Tween 20. La lectura de densidad óptica (DO) se realizó a una longitud de onda de 450 nm. Las concentración de citoquinas presentes en las muestras se calcularon mediante extrapolación de los datos de DO en la curva de trabajo utilizando el programa GraphPad Prism7.

## Expresión de proteínas mediante Western blot

Luego de cuantificar la cantidad de proteínas presentes en las muestras mediante la técnica de Bradford, se diluyeron en solución tampón de carga (83% tampón de carga+ 17%  $\beta$ -mercaptoetanol) y se sembró la misma cantidad de proteína en cada calle de un gel de poliacrilamida al 12 %. Luego de realizar la corrida electroforética durante 1 hora a 100 V, se realizó la transferencia a la membrana de celulosa (Biorad) a voltaje constante de 100 V durante 80 min. Las membranas fueron bloqueadas con PBS-Albúmina 1% durante 1 h y se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente a 4°C. Luego de lavar con TBS se colocó el anticuerpo secundario conjugado a fluoroforo (Li-Cor, EEUU) y transcurrida 1 h de incubación a temperatura ambiente, las membranas fueron escaneadas en el lector de fluorescencia Licor Odyssey. La intensidad de las bandas fue analizada de manera semicuantitativa con el programa Image Studio de LiCor. La expresión de la proteína en cuestión fue relativizada a la expresión de actina.

## Ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa

### **Extracción de ADN**

Las muestras de hígado, corazón y músculo esquelético se colocaron en tubos de 1,5 ml y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento. La extracción de ADN se realizó con el reactivo TriReagent (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se procedió a la disrupción mecánica del tejido utilizando 0,5 ml del reactivo. Luego de agregar 0,1 ml de cloroformo, las muestras fueron centrifugadas por 15 min a 12000g y a 4°C. La fase fenol-cloroformo y la interfase fueron precipitadas utilizando 0,15 ml de etanol 100% y se lavó dos veces con una solución de citrato de sodio 0,1M al 10% de etanol (pH=8,5). Luego de realizar dos lavados con etanol 75%, el ADN se resuspendió en buffer Tris-EDTA pH=7,5. La concentración de ADN en cada una de las muestras se evaluó determinando la absorbancia a 260 en el equipo BIOTEK (BioTek Instruments, Inc.).

## **Extracción de ARN**

La extracción de ARN se realizó en una suspensión de células de bazo y en macrófagos derivados de médula ósea utilizando el reactivo TriReagent (Sigma-Aldrich) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incorporaron 0,5 ml de TriReagent a las células lavadas con PBS frío. Luego de homogeneizar, se añadieron 0,1 ml de cloroformo y una vez separadas las fases se tomó la porción superior, correspondiente a la fase acuosa, la cual contiene el ARN. Para la precipitación se utilizaron 0,25 ml de Isopropanol. Posteriormente, se realizaron dos lavados con 1 ml de etanol al 75% cada uno para eliminar restos de sales. Luego, de eliminar el etanol se dejó secar la muestra y se la resuspendió en agua ultra pura. La concentración de ARN de las muestras se determinó mediante espectrofotometría en el equipo BIOTEK.

## **qPCR para la cuantificación de ADN de *T. cruzi***

Los cebadores o primers y la sonda Taqman utilizadas para la detección del ADN satélite de *T. cruzi* se sintetizaron de acuerdo al diseño publicado por Piron y col.<sup>173</sup> La cantidad de ADN satélite de *T. cruzi* se relativizó a la expresión de GAPDH. Las sondas utilizadas se encuentran conjugadas con FAM (6-carboxifluoresceína), el colorante quencher utilizado fue TMRA (tetrametilrodamina). A partir de los valores obtenidos de Ct (Cycle threshold), se calculó el  $\Delta$ CT, es decir, la diferencia entre el CT del gen blanco y el control endógeno y se lo ajustó a unidades relativas.

## **RT-qPCR para la cuantificación de la expresión de Cyp1A1 y AhR**

Se aisló ARN y a partir de este se obtuvo ADNc mediante el kit Quantitect Reverse Transcription Kit de Qiagen. La RT-qPCR se realizó en el termociclador SteoOnePlus

(Applied Biosystems- ABI) y para la reacción de amplificación se utilizó Power Sybr Green Master Mix (ABI).

Se utilizaron las siguientes secuencias de cebadores:

Gen	Sentido	Anti-sentido
Cyp1a1	5-CATTCCTGTCCTCCGTTACCTG-3	5-CTGTCTGTGATGTCCCGGATG-3
Ahr	5-GAAGGAGAGTTCTTGTTACAGGCG-3	5-GGAGGAAGCATAGAAGACCAAGG-3
$\beta$ -actina	5-TCTTGGGTATGGAATCCTGTGG-3	5- ATCCTGTCAGCAATGCCTGG-3

La expresión del ARNm se analizó mediante el software StepOne se obtuvieron los valores de CT, los cuales fueron analizados en Microsoft Excel. Se obtuvo el promedio de los valores de Ct para cada muestra y se normalizó respecto a la expresión del control interno ( $\beta$ -actina),  $\Delta$ CT = CT target – CT endógeno. La expresión génica de los MDMO de Balb/c se utilizó para normalizar los valores de los grupos tratados. Para el cálculo de la expresión de AhR en bazo se utilizó el Método de la curva estándar relativa, la curva relativa se realizó utilizando el grupo NI de cada una de las cepas de ratón.

#### Ensayo de luciferasa para detección de agonistas de AhR en plasma

El ensayo con plásmido reportero para la detección de ligandos de AhR en muestras de plasma fue realizado de acuerdo al procedimiento reportado por Rothhammer y col.<sup>194</sup> Se transfectaron células HEK293 o 4T1 con el plásmido pGud-Luc utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen). En el plásmido se encuentra el promotor de luciferasa, y en este las secuencias DRE (elemento de respuesta a dioxinas) presentes en el promotor de CYP1A1, por lo que de haber agonistas de AhR en la muestra en cuestión con el cual se incuban las células transfectadas, éstos activan AhR que se une a estas secuencias DRE y favorecen la transcripción del gen de luciferasa. De manera simultánea, las células son transfectadas con el plásmido pTK-Renilla. La señal de luciferasa fue ajustada a la señal de renilla emitida en el mismo pocillo.

Luego de lisar las células estas fueron colocadas en placas de 96 pocillos para la detección de fluorescencia. Para determinar la actividad luciferasa se utilizó el kit “Dual Luciferase Assay” (Promega, EEUU), agregando los reactivos en el luminómetro de manera automática por los inyectores, siguiendo los tiempos y volúmenes indicados por el fabricante. En las muestras de plasma de pacientes se consideró como 100% de señal al promedio de intensidad registrado en el grupo Control y los demás valores se expresaron como porcentaje de intensidad con relación a este 100%. En las muestras de plasma de ratones B6 y Balb/c se consideró como 100% de señal al promedio de intensidad registrado en cada grupo NI.

### Metabolómica dirigida

La cuantificación de los niveles de metabolitos del Trp en plasma de pacientes infectados con *T. cruzi* y controles fue realizado por metabolómica dirigida mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Las muestras de plasma fueron analizadas en un espectrómetro de masas triple cuadrupolo 4000 QTRAP (AB SCIEX, Framingham MA) acoplado a una bomba HPLC binaria Serie 1200 (Agilent, Santa Clara, CA) y un HTS PAL Autosampler (Leap Technologies, Carrboro, NC). Para confirmar la identidad de cada metabolito, estos fueron comparados con muestras patrón.

### Análisis estadístico

En primer lugar, se evaluó la distribución de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk. Los datos que presentaron una distribución normal fueron analizados con test paramétricos: Student t-test, ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías. Los datos que mostraron una distribución que no se ajusta a la normal fueron analizados mediante el test no paramétricos U de Mann Whitney. En el caso de los análisis de comparaciones

múltiples los post test utilizados fueron los recomendados por el programa estadístico empleado, GraphPad Prism7.

Para calcular las diferencias en sobrevida se utilizó el test Gehan-Breslow-Wilcoxon. Se consideró que existen diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ .



# BIBLIOGRAFÍA



1. Moncayo, Á. Cien años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas. *Infectio* **13**, 243–245 (2009).
2. Aufderheide, A. C. *et al.* A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2034–2039 (2004).
3. Rassi, A., Rassi, A. & Marcondes de Rezende, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect. Dis. Clin. North Am.* **26**, 275–291 (2012).
4. Bern, C. Chagas' Disease. *N. Engl. J. Med.* **373**, 456–466 (2015).
5. Combs, T. P. *et al.* The Adipocyte as an Important Target Cell for *Trypanosoma cruzi* Infection. *J. Biol. Chem.* **280**, 24085–24094 (2005).
6. Ferreira, A. V. M. *et al.* Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes Infect.* **13**, 1002–1005 (2011).
7. Nagajyothi, F. *et al.* Response of adipose tissue to early infection with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain). *J. Infect. Dis.* **205**, 830–840 (2012).
8. Pérez-Molina, J. A. & Molina, I. Chagas disease. *The Lancet* **391**, 82–94 (2018).
9. World Health Organization. Weekly epidemiological record: Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. (2015).
10. Coura, J. R. & Viñas, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* **465**, S6-7 (2010).
11. Tosello Boari, J. *Estudio de los mecanismos protectores mediados por citoquinas de la familia de interleuquina 17 durante la infección con Trypanosoma cruzi (Tesis de doctorado)*. (2015).

12. Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M. J. & Montgomery, S. P. Trypanosoma cruzi and Chagas' Disease in the United States. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 655–681 (2011).
13. Nunes Maria Carmo Pereira *et al.* Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* **138**, e169–e209 (2018).
14. Chatelain, E. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. *J. Biomol. Screen.* (2014) doi:10.1177/1087057114550585.
15. Añez, N. *et al.* Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**, 726–732 (1999).
16. Andrade, Z. A., Andrade, S. G., Sadigursky, M. & Maguire, J. H. Experimental Chagas' disease in dogs. A pathologic and ECG study of the chronic indeterminate phase of the infection. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **105**, 460–464 (1981).
17. Lopes, E. R. *et al.* Anatomic-pathology of heart of asymptomatic chagas' patients who had a violent death. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **76**, 189–197 (1981).
18. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 445–489 (2010).
19. Rassi, A., Rassi, A. & Marin-Neto, J. A. Chagas disease. *The Lancet* **375**, 1388–1402 (2010).
20. Souza, P. E. A. *et al.* Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect. Immun.* **72**, 5283–5291 (2004).

21. Gomes, J. a. S. *et al.* Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect. Immun.* **71**, 1185–1193 (2003).
22. Carrera-Silva, E. A. *et al.* TLR2, TLR4 and TLR9 are differentially modulated in liver lethally injured from BALB/c and C57BL/6 mice during *Trypanosoma cruzi* acute infection. *Mol. Immunol.* **45**, 3580–3588 (2008).
23. Higuchi, M. de L. *et al.* Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc. Pathol.* **2**, 101–106 (1993).
24. McCurley, T. L. *et al.* Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**, 563–570 (1998).
25. Tarleton, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* **31**, 550–554 (2001).
26. Acevedo, G. R., Girard, M. C. & Gómez, K. A. The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
27. Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. TOLL-LIKE RECEPTORS. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335–376 (2003).
28. Campos, M. A. S. *et al.* Activation of Toll-Like Receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from a Protozoan Parasite. *J. Immunol.* **167**, 416–423 (2001).

29. Oliveira, A.-C. *et al.* Expression of Functional TLR4 Confers Proinflammatory Responsiveness to *Trypanosoma cruzi* Glycoinositolphospholipids and Higher Resistance to Infection with *T. cruzi*. *J. Immunol.* **173**, 5688–5696 (2004).
30. Tarleton, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 430–434 (2007).
31. Machado, F. S. *et al.* Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. *Front. Biosci. Elite Ed.* **4**, 1743–1758 (2012).
32. Frosch, S., Kraus, S. & Fleischer, B. *Trypanosoma cruzi* is a potent inducer of interleukin-12 production in macrophages. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **185**, 189–193 (1996).
33. Cardillo, F., Voltarelli, J. C., Reed, S. G. & Silva, J. S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect. Immun.* **64**, 128–134 (1996).
34. Lieke, T., Steeg, C., Graefe, S. E. B., Fleischer, B. & Jacobs, T. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. *Clin. Exp. Immunol.* **145**, 357–364 (2006).
35. Green, S. J., Crawford, R. M., Hockmeyer, J. T., Meltzer, M. S. & Nacy, C. A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **9**.
36. Ding, A. H., Nathan, C. F. & Stuehr, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison

- of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **141**, 2407–2412 (1988).
37. Alvarez, M. N., Peluffo, G., Piacenza, L. & Radi, R. Intrapagosomal Peroxynitrite as a Macrophage-derived Cytotoxin against Internalized *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **286**, 6627–6640 (2011).
38. Fallarino, F. *et al.* T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* **9**, 1069 (2002).
39. Gupta, S. L. *et al.* Antiparasitic and antiproliferative effects of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme expression in human fibroblasts. *Infect. Immun.* **62**, 2277–2284 (1994).
40. Pfefferkorn, E. R. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 908–912 (1984).
41. Knubel, C. P. *et al.* 3-Hydroxykynurenine, a Tryptophan Metabolite Generated during the Infection, Is Active Against *Trypanosoma cruzi*. *ACS Med. Chem. Lett.* **8**, 757–761 (2017).
42. Junqueira, C. *et al.* The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev. Mol. Med.* **12**, e29 (2010).
43. Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., Hieny, S., James, S. L. & Sher, A. The microbicidal activity of interferon- $\gamma$ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-

- arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ . *Eur. J. Immunol.* **22**, 2501–2506 (1992).
44. Reed, S. G. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **140**, 4342–4347 (1988).
45. Hölscher, C. *et al.* Defective Nitric Oxide Effector Functions Lead to Extreme Susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-Infected Mice Deficient in Gamma Interferon Receptor or Inducible Nitric Oxide Synthase. *Infect. Immun.* **66**, 1208–1215 (1998).
46. Galvão Da Silva, A. P., Jacysyn, J. F. & Abrahamsohn, I. D. A. Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. *Immunology* **108**, 230–237 (2003).
47. Bermejo, D. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. *Immunology* **132**, 123–133 (2011).
48. Boscardin, S. B. *et al.* Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 1373–1384 (2010).
49. Tarleton, R. L. CD8+ T Cells in *Trypanosoma cruzi* Infection. *Semin. Immunopathol.* **37**, 233–238 (2015).
50. Tarleton, R. L., Sun, J., Zhang, L. & Postan, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect. Immun.* **62**, 1820–1829 (1994).

51. Tarleton, R. L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **144**, 717–724 (1990).
52. Zijlstra, M. *et al.* Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature* **344**, 742–746 (1990).
53. Tarleton, R. L., Koller, B. H., Latour, A. & Postan, M. Susceptibility of  $\beta$ 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature* **356**, 338–340 (1992).
54. Abel, L. C. J. *et al.* Chronic Chagas' Disease Cardiomyopathy Patients Display an Increased IFN- $\gamma$  Response to *Trypanosoma cruzi* Infection. *J. Autoimmun.* **17**, 99–107 (2001).
55. Vitelli-Avelar, D. M. *et al.* Chagasic Patients with Indeterminate Clinical Form of the Disease have High Frequencies of Circulating CD3+CD16–CD56+ Natural Killer T Cells and CD4+CD25High Regulatory T Lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* **62**, 297–308 (2005).
56. de Araújo, F. F. *et al.* Foxp3+CD25high CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology* **217**, 768–777 (2012).
57. Araujo Furlan, C. L. *et al.* Limited Foxp3+ Regulatory T Cells Response During Acute *Trypanosoma cruzi* Infection Is Required to Allow the Emergence of Robust Parasite-Specific CD8+ T Cell Immunity. *Front. Immunol.* **9**, (2018).

58. González, F. B. *et al.* Immunoendocrine dysbalance during uncontrolled T. cruzi infection is associated with the acquisition of a Th-1-like phenotype by Foxp3+ T cells. *Brain. Behav. Immun.* **45**, 219–232 (2015).
59. Ferreira, B. L. *et al.* BALB/c and C57BL/6 Mice Cytokine Responses to Trypanosoma cruzi Infection Are Independent of Parasite Strain Infectivity. *Front. Microbiol.* **9**, (2018).
60. Ersching, J., Basso, A. S., Kalich, V. L. G., Bortoluci, K. R. & Rodrigues, M. M. A Human Trypanosome Suppresses CD8+ T Cell Priming by Dendritic Cells through the Induction of Immune Regulatory CD4+ Foxp3+ T Cells. *PLoS Pathog.* **12**, e1005698 (2016).
61. Hahn, M. E., Karchner, S. I., Shapiro, M. A. & Perera, S. A. Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13743–13748 (1997).
62. Hahn, M. E., Karchner, S. I. & Merson, R. R. Diversity as opportunity: Insights from 600 million years of AHR evolution. *Curr. Opin. Toxicol.* **2**, 58–71 (2017).
63. Massari, M. E. & Murre, C. Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 429–440 (2000).
64. Dolwick, K. M., Swanson, H. I. & Bradfield, C. A. In vitro analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8566–8570 (1993).
65. Burbach, K. M., Poland, A. & Bradfield, C. A. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 8185–8189 (1992).

66. McIntosh, B. E., Hogenesch, J. B. & Bradfield, C. A. Mammalian Per-Arnt-Sim Proteins in Environmental Adaptation. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 625–645 (2010).
67. Enan, E. & Matsumura, F. Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1599–1612 (1996).
68. Stevens, E. A., Mezrich, J. D. & Bradfield, C. A. The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology* **127**, 299–311 (2009).
69. Stockinger, B., Di Meglio, P., Gialitakis, M. & Duarte, J. H. The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 403–432 (2014).
70. Rothhammer, V. & Quintana, F. J. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 184–197 (2019).
71. McGuire, J., Whitelaw, M. L., Pongratz, I., Gustafsson, J. A. & Poellinger, L. A cellular factor stimulates ligand-dependent release of hsp90 from the basic helix-loop-helix dioxin receptor. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2438–2446 (1994).
72. Hao, N. & Whitelaw, M. L. The emerging roles of AhR in physiology and immunity. *Biochem. Pharmacol.* **86**, 561–570 (2013).
73. Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* **13**, 20–25 (1999).

74. Oshima, M., Mimura, J., Yamamoto, M. & Fujii-Kuriyama, Y. Molecular mechanism of transcriptional repression of AhR repressor involving ANKRA2, HDAC4, and HDAC5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **364**, 276–282 (2007).
75. Ohtake, F., Fujii-Kuriyama, Y. & Kato, S. AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 474–484 (2009).
76. Luecke-Johansson, S. *et al.* A Molecular Mechanism To Switch the Aryl Hydrocarbon Receptor from a Transcription Factor to an E3 Ubiquitin Ligase. *Mol. Cell. Biol.* **37**, (2017).
77. Ohtake, F. *et al.* Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* **446**, 562–566 (2007).
78. Poland, A., Glover, E. & Kende, A. S. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **251**, 4936–4946 (1976).
79. Stejskalova, L., Dvorak, Z. & Pavek, P. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. *Curr. Drug Metab.* **12**, 198–212 (2011).
80. Izawa, H., Kohara, M., Watanabe, G., Taya, K. & Sagai, M. Effects of diesel exhaust particles on the male reproductive system in strains of mice with different aryl hydrocarbon receptor responsiveness. *J. Reprod. Dev.* **53**, 1191–1197 (2007).
81. Nguyen, L. P. & Bradfield, C. A. The Search for Endogenous Activators of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 102–116 (2008).

82. Gutiérrez-Vázquez, C. & Quintana, F. J. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity* **48**, 19–33 (2018).
83. Quintana, F. J. & Sherr, D. H. Aryl Hydrocarbon Receptor Control of Adaptive Immunity. *Pharmacol. Rev.* **65**, 1148–1161 (2013).
84. Phelan, D., Winter, G. M., Rogers, W. J., Lam, J. C. & Denison, M. S. Activation of the Ah Receptor Signal Transduction Pathway by Bilirubin and Biliverdin. *Arch. Biochem. Biophys.* **357**, 155–163 (1998).
85. Sinal, C. J. & Bend, J. R. Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Induction of Cyp1a1 by Bilirubin in Mouse Hepatoma Hepa 1c1c7 Cells. *Mol. Pharmacol.* **52**, 590–599 (1997).
86. Seidel, S. D. *et al.* Activation of the Ah Receptor Signaling Pathway by Prostaglandins. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **15**, 187–196 (2001).
87. Schaldach, C. M., Riby, J. & Bjeldanes, L. F. Lipoxin A4: A New Class of Ligand for the Ah Receptor. *Biochemistry* **38**, 7594–7600 (1999).
88. Degner, S. C., Kemp, M. Q., Hockings, J. K. & Romagnolo, D. F. Cyclooxygenase-2 promoter activation by the aromatic hydrocarbon receptor in breast cancer mcf-7 cells: repressive effects of conjugated linoleic acid. *Nutr. Cancer* **59**, 248–257 (2007).
89. Puga, A. *et al.* Sustained increase in intracellular free calcium and activation of cyclooxygenase-2 expression in mouse hepatoma cells treated with dioxin. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 1287–1296 (1997).
90. Badawy, A. A.-B. Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. *Int. J. Tryptophan Res. IJTR* **10**, (2017).

91. Badawy, A. A.-B. Tryptophan metabolism, disposition and utilization in pregnancy. *Biosci. Rep.* **35**, e00261–e00261 (2015).
92. Mezrich, J. D. *et al.* An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 3190–3198 (2010).
93. Lowe, M. M. *et al.* Identification of Cinnabarinic Acid as a Novel Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand That Drives IL-22 Production. *PLoS ONE* **9**, (2014).
94. DiNatale, B. C. *et al.* Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand that Synergistically Induces Interleukin-6 in the Presence of Inflammatory Signaling. *Toxicol. Sci.* **115**, 89–97 (2010).
95. Manzella, C. *et al.* Serotonin is an endogenous regulator of intestinal CYP1A1 via AhR. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
96. Seok, S.-H. *et al.* Trace derivatives of kynurenine potently activate the aryl hydrocarbon receptor (AHR). *J. Biol. Chem.* **293**, 1994–2005 (2018).
97. Youssef, A. *et al.* 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) is a Very Minor Photoproduct of Tryptophan at Biologically Relevant Doses of UVB and Simulated Sunlight. *Photochem. Photobiol.* **95**, 237–243 (2019).
98. Song, J. *et al.* A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 14694–14699 (2002).
99. Quintana, F. J. *et al.* An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 20768–20773 (2010).

100. Nugent, L. F. *et al.* ITE, A Novel Endogenous Nontoxic Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand, Efficiently Suppresses EAU and T-Cell-Mediated Immunity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 7463–7469 (2013).
101. Wang, K. *et al.* An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand inhibits proliferation and migration of human ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* **340**, 63–71 (2013).
102. Cheng, J. *et al.* Tryptophan derivatives regulate the transcription of Oct4 in stem-like cancer cells. *Nat. Commun.* **6**, 7209 (2015).
103. Roager, H. M. & Licht, T. R. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat. Commun.* **9**, 1–10 (2018).
104. Schroeder, J. C. *et al.* The uremic toxin 3-indoxyl sulfate is a potent endogenous agonist for the human aryl hydrocarbon receptor. *Biochemistry* **49**, 393–400 (2010).
105. Marinelli, L. *et al.* Identification of the novel role of butyrate as AhR ligand in human intestinal epithelial cells. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
106. Jin, U.-H. *et al.* Short Chain Fatty Acids Enhance Aryl Hydrocarbon (Ah) Responsiveness in Mouse Colonocytes and Caco-2 Human Colon Cancer Cells. *Sci. Rep.* **7**, 10163 (2017).
107. Cheng, Y. *et al.* Editor's Highlight: Microbial-Derived 1,4-Dihydroxy-2-naphthoic Acid and Related Compounds as Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists/Antagonists: Structure–Activity Relationships and Receptor Modeling. *Toxicol. Sci.* **155**, 458–473 (2017).

108. Okada, Y. Propionibacterium freudenreichii component 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) attenuates dextran sodium sulphate induced colitis by modulation of bacterial flora and lymphocyte homing. *Gut* **55**, 681–688 (2006).
109. Shinde, R. & McGaha, T. L. The Aryl Hydrocarbon Receptor: Connecting Immunity to the Microenvironment. *Trends Immunol.* **39**, 1005–1020 (2018).
110. Schmidt, J. V., Su, G. H., Reddy, J. K., Simon, M. C. & Bradfield, C. A. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 6731–6736 (1996).
111. Unnisa, Z. *et al.* Aryl Hydrocarbon Receptor Deficiency in an Exon 3 Deletion Mouse Model Promotes Hematopoietic Stem Cell Proliferation and Impacts Endosteal Niche Cells. *Stem Cells Int.* **2016**, 4536187 (2016).
112. Lund, A. K., Goens, M. B., Kanagy, N. L. & Walker, M. K. Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1, and mean arterial blood pressure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **193**, 177–187 (2003).
113. Qiu, J. *et al.* The Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Gut Immunity through Modulation of Innate Lymphoid Cells. *Immunity* **36**, 92–104 (2012).
114. Zelante, T. *et al.* Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22. *Immunity* **39**, 372–385 (2013).
115. Nguyen, N. T., Hanieh, H., Nakahama, T. & Kishimoto, T. The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses. *Int. Immunol.* **25**, 335–343 (2013).

116. Wagage, S. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor promotes IL-10 production by NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**, 1661–1670 (2014).
117. Quintana, F. J. *et al.* Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **453**, 65–71 (2008).
118. Veldhoen, M. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* **453**, 106–109 (2008).
119. Duarte, J. H., Meglio, P. D., Hirota, K., Ahlfors, H. & Stockinger, B. Differential Influences of the Aryl Hydrocarbon Receptor on Th17 Mediated Responses in vitro and in vivo. *PLOS ONE* **8**, e79819 (2013).
120. Gagliani, N. *et al.* Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* **523**, 221–225 (2015).
121. Wang, H., Wei, Y. & Yu, D. Control of lymphocyte homeostasis and effector function by the aryl hydrocarbon receptor. *Int. Immunopharmacol.* **28**, 818–824 (2015).
122. Wheeler, J. L. H., Martin, K. C., Resseguie, E. & Lawrence, B. P. Differential Consequences of Two Distinct AhR Ligands on Innate and Adaptive Immune Responses to Influenza A Virus. *Toxicol. Sci.* **137**, 324–334 (2014).
123. Ehrlich, A. K., Pennington, J. M., Bisson, W. H., Kolluri, S. K. & Kerkvliet, N. I. TCDD, FICZ, and Other High Affinity AhR Ligands Dose-Dependently Determine the Fate of CD4+ T Cell Differentiation. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **161**, 310–320 (2018).
124. Boule, L. A., Burke, C. G., Jin, G.-B. & Lawrence, B. P. Aryl hydrocarbon receptor signaling modulates antiviral immune responses: ligand metabolism rather than chemical source is the stronger predictor of outcome. *Sci. Rep.* **8**, 1–15 (2018).

125. Hauben, E. *et al.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor promotes allograft-specific tolerance through direct and dendritic cell-mediated effects on regulatory T cells. *Blood* **112**, 1214–1222 (2008).
126. Zhang, L. *et al.* Suppression of experimental autoimmune uveoretinitis by inducing differentiation of regulatory T cells via activation of aryl hydrocarbon receptor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 2109–2117 (2010).
127. Benson, J. M. & Shepherd, D. M. Aryl hydrocarbon receptor activation by TCDD reduces inflammation associated with Crohn's disease. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **120**, 68–78 (2011).
128. Singh, N. P. *et al.* Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Leads to Reciprocal Epigenetic Regulation of FoxP3 and IL-17 Expression and Amelioration of Experimental Colitis. *PLOS ONE* **6**, e23522 (2011).
129. Schulz, V. J. *et al.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor suppresses sensitization in a mouse peanut allergy model. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **123**, 491–500 (2011).
130. Kimura, A., Naka, T., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y. & Kishimoto, T. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 9721–9726 (2008).
131. Funatake, C. J., Marshall, N. B., Stepan, L. B., Mourich, D. V. & Kerkvliet, N. I. Cutting edge: activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin generates a population of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells with

- characteristics of regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 4184–4188 (2005).
132. Gramatzki, D. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor inhibition downregulates the TGF- $\beta$ /Smad pathway in human glioblastoma cells. *Oncogene* **28**, 2593–2605 (2009).
133. Gandhi, R. *et al.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **11**, 846–853 (2010).
134. Hall, J. A., Grainger, J. R., Spencer, S. P. & Belkaid, Y. The role of retinoic acid in tolerance and immunity. *Immunity* **35**, 13–22 (2011).
135. Nguyen, N. T. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 19961–19966 (2010).
136. Zang, X. *et al.* Regulation of proinflammatory monocyte activation by the kynurenine-AhR axis underlies immunometabolic control of depressive behavior in mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **32**, 1944–1956 (2018).
137. Awasthi, A. *et al.* A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat. Immunol.* **8**, 1380–1389 (2007).
138. Murugaiyan, G. *et al.* IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 2435–2443 (2009).
139. Apetoh, L. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat. Immunol.* **11**, 854–861 (2010).

140. Mascanfroni, I. D. *et al.* Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- $\alpha$ . *Nat. Med.* **21**, 638–646 (2015).
141. Quintana, F. J. *et al.* Aiolos promotes TH17 differentiation by directly silencing IL2 expression. *Nat. Immunol.* **13**, 770–777 (2012).
142. Yeste, A. *et al.* IL-21 induces IL-22 production in CD4+ T-cells. *Nat. Commun.* **5**, 3753 (2014).
143. Longhi, M. S. *et al.* Bilirubin suppresses Th17 immunity in colitis by upregulating CD39. *JCI Insight* **2**, (2017).
144. Lee, Y. *et al.* Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunol.* **13**, 991–999 (2012).
145. Heilmann, C., Grandjean, P., Weihe, P., Nielsen, F. & Budtz-Jørgensen, E. Reduced antibody responses to vaccinations in children exposed to polychlorinated biphenyls. *PLoS Med.* **3**, e311 (2006).
146. Hochstenbach, K. *et al.* Toxicogenomic profiles in relation to maternal immunotoxic exposure and immune functionality in newborns. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **129**, 315–324 (2012).
147. Stølevik, S. B. *et al.* Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from the maternal diet may be associated with immunosuppressive effects that persist into early childhood. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **51**, 165–172 (2013).

148. Lawrence, B. P. & Vorderstrasse, B. A. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Diminishes the Memory Response to Homotypic Influenza Virus Infection but Does Not Impair Host Resistance. *Toxicol. Sci.* **79**, 304–314 (2004).
149. Mitchell, K. A. & Lawrence, B. P. T cell receptor transgenic mice provide novel insights into understanding cellular targets of TCDD: suppression of antibody production, but not the response of CD8+ T cells, during infection with influenza virus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **192**, 275–286 (2003).
150. Lawrence, B. P. & Vorderstrasse, B. A. New insights into the aryl hydrocarbon receptor as a modulator of host responses to infection. *Semin. Immunopathol.* **35**, 615–626 (2013).
151. Fernandez-Salguero, P. M., Hilbert, D. M., Rudikoff, S., Ward, J. M. & Gonzalez, F. J. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **140**, 173–179 (1996).
152. Brown, E. M., Sadarangani, M. & Finlay, B. B. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat. Immunol.* **14**, 660–667 (2013).
153. Moura-Alves, P. *et al.* AhR sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence. *Nature* **512**, 387–392 (2014).
154. Bowers, O. J. *et al.* 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) reduces *Leishmania* major burdens in C57BL/6 mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**, 749–752 (2006).

155. DeKrey, G. K., Teagarden, R. E., Lenberg, J. L. & Titus, R. G. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin slows the progression of experimental cutaneous Leishmaniasis in susceptible BALB/c and SCID mice. *PLoS One* **8**, e76259 (2013).
156. Funseth, E., Wesslén, L., Lindh, U., Friman, G. & Ilbäck, N.-G. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on trace elements, inflammation and viral clearance in the myocardium during coxsackievirus B3 infection in mice. *Sci. Total Environ.* **284**, 135–147 (2002).
157. Burleson, G. R. *et al.* Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on influenza virus host resistance in mice. *Fundam. Appl. Toxicol. Off. J. Soc. Toxicol.* **29**, 40–47 (1996).
158. Luebke, R. W., Copeland, C. B., Bishop, L. R., Daniels, M. J. & Gilmour, M. I. Mortality in dioxin-exposed mice infected with influenza: mitochondrial toxicity (reye's-like syndrome) versus enhanced inflammation as the mode of action. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **69**, 109–116 (2002).
159. Roggero, E. *et al.* Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clin. Exp. Immunol.* **128**, 421–428 (2002).
160. Knubel, C. P. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.* **24**, 2689–2701 (2010).
161. Knubel, C. P. *et al.* 3-Hydroxy Kynurenine Treatment Controls *T. cruzi* Replication and the Inflammatory Pathology Preventing the Clinical Symptoms of Chronic Chagas Disease. *PLoS ONE* **6**, e26550 (2011).

162. Thomas, R. S., Penn, S. G., Holden, K., Bradfield, C. A. & Rank, D. R. Sequence variation and phylogenetic history of the mouse Ahr gene. *Pharmacogenetics* **12**, 151–163 (2002).
163. Poland, A., Palen, D. & Glover, E. Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon receptor. *Mol. Pharmacol.* **46**, 915–921 (1994).
164. Julliard, W., Fechner, J. H. & Mezrich, J. D. The Aryl Hydrocarbon Receptor Meets Immunology: Friend or Foe? A Little of Both. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
165. Vogel, C. F. A., Goth, S. R., Dong, B., Pessah, I. N. & Matsumura, F. Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**, 331–335 (2008).
166. Rothhammer, V. *et al.* Detection of aryl hydrocarbon receptor agonists in human samples. *Sci. Rep.* **8**, 4970 (2018).
167. Ikuta, T., Kobayashi, Y. & Kawajiri, K. Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 545–550 (2004).
168. Kerkvliet, N. I. *et al.* Activation of aryl hydrocarbon receptor by TCDD prevents diabetes in NOD mice and increases Foxp3<sup>+</sup> T cells in pancreatic lymph nodes. *Immunotherapy* **1**, 539–547 (2009).
169. Martin, D. L. *et al.* CD8<sup>β</sup> T-Cell Responses to *Trypanosoma cruzi* Are Highly Focused on Strain-Variant trans-Sialidase Epitopes. *PLoS Pathog.* **2**, 10 (2006).

170. Camacho, I. A., Hassuneh, M. R., Nagarkatti, M. & Nagarkatti, P. S. Enhanced activation-induced cell death as a mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced immunotoxicity in peripheral T cells. *Toxicology* **165**, 51–63 (2001).
171. Singh, N. P., Nagarkatti, M. & Nagarkatti, P. Primary Peripheral T Cells Become Susceptible to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin-Mediated Apoptosis in Vitro upon Activation and in the Presence of Dendritic Cells. *Mol. Pharmacol.* **73**, 1722–1735 (2008).
172. Yamaguchi, T. *et al.* Control of Immune Responses by Antigen-Specific Regulatory T Cells Expressing the Folate Receptor. *Immunity* **27**, 145–159 (2007).
173. Piron, M. *et al.* Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* **103**, 195–200 (2007).
174. Fernandez-Salguero, P. *et al.* Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* **268**, 722–726 (1995).
175. Lawrence, B. P., Roberts, A. D., Neumiller, J. J., Cundiff, J. A. & Woodland, D. L. Aryl hydrocarbon receptor activation impairs the priming but not the recall of influenza virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the lung. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 5819–5828 (2006).
176. Gironès, N. *et al.* Global Metabolomic Profiling of Acute Myocarditis Caused by *Trypanosoma cruzi* Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e3337 (2014).
177. Salvatella, R., Irabedra, P., Sánchez, D., Castellanos, L. G. & Espinal, M. South-south cooperation for Chagas disease. *The Lancet* **382**, 395–396 (2013).

178. Moretti, E., Basso, B., Cervetta, L., Brigada, A. & Barbieri, G. Patterns of cytokines and soluble cellular receptors in the sera of children with acute chagas' disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**, 1324–1327 (2002).
179. Araujo, F. F. *et al.* Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **12**, 2797–2806 (2007).
180. da Silveira, A. B. M. *et al.* Characterization of the presence and distribution of Foxp3(+) cells in chagasic patients with and without megacolon. *Hum. Immunol.* **70**, 65–67 (2009).
181. de Araújo, F. F. *et al.* Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, e992 (2011).
182. Bielefeld, K. A., Lee, C. & Riddick, D. S. Regulation of Aryl Hydrocarbon Receptor Expression and Function by Glucocorticoids in Mouse Hepatoma Cells. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 543–551 (2008).
183. Timsit, Y. E., Chia, F. S.-C., Bhatena, A. & Riddick, D. S. Aromatic hydrocarbon receptor expression and function in liver of hypophysectomized male rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **185**, 136–145 (2002).
184. Roggero, E. *et al.* Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Endocrinol.* **190**, 495–503 (2006).
185. Oxenkrug, G. F. Tryptophan–Kynurenine Metabolism as a Common Mediator of Genetic and Environmental Impacts in Major Depressive Disorder: The Serotonin Hypothesis Revisited 40 Years Later. *Isr. J. Psychiatry Relat. Sci.* **47**, 56–63 (2010).

186. Yamamoto, Y., Kiyohara, C., Ogata-Suetsugu, S., Hamada, N. & Nakanishi, Y. Association between genetic polymorphisms involved in the hypoxia-inducible factor pathway and lung cancer risk: a case-control study in Japan. *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* **13**, 234–242 (2017).
187. Huang, S. *et al.* AhR expression and polymorphisms are associated with risk of coronary arterial disease in Chinese population. *Sci. Rep.* **5**, 8022 (2015).
188. Wang, X.-W. *et al.* The association of functional polymorphisms in the aryl hydrocarbon receptor (AHR) gene with the risk of vitiligo in Han Chinese populations. *Br. J. Dermatol.* **166**, 1081–1087 (2012).
189. Shimada, T. *et al.* Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons with human cytochrome P450 1B1 in inhibiting catalytic activity. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 2313–2323 (2008).
190. Ecco, G. *et al.* Initial characterization of a recombinant kynureninase from *Trypanosoma cruzi* identified from an EST database. *Gene* **448**, 1–6 (2009).
191. Gargaro, M. *et al.* Engagement of Nuclear Coactivator 7 by 3-Hydroxyanthranilic Acid Enhances Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor in Immunoregulatory Dendritic Cells. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
192. Alasoo, K. *et al.* Transcriptional profiling of macrophages derived from monocytes and iPS cells identifies a conserved response to LPS and novel alternative transcription. *Sci. Rep.* **5**, 12524 (2015).

193. Pollenz, R. S. The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation. *Chem. Biol. Interact.* **141**, 41–61 (2002).
194. Rothhammer, V. *et al.* Dynamic regulation of serum aryl hydrocarbon receptor agonists in MS. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* **4**, e359 (2017).
195. Kaysen, G. A. *et al.* Relationships among inflammation nutrition and physiologic mechanisms establishing albumin levels in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **61**, 2240–2249 (2002).
196. Badawy, A. A.-B. & Guillemin, G. The Plasma [Kynurenine]/[Tryptophan] Ratio and Indoleamine 2,3-Dioxygenase: Time for Appraisal. *Int. J. Tryptophan Res. IJTR* **12**, (2019).
197. Gregory Oxenkrug, R. R. & Gregory Oxenkrug, R. R. N-Acetylserotonin and Aging-Associated Cognitive Impairment and Depression. *Aging Dis.* **3**, 330–338 (2012).
198. Sun, H., Gusdon, A. M. & Qu, S. Effects of melatonin on cardiovascular diseases: progress in the past year. *Curr. Opin. Lipidol.* **27**, 408–413 (2016).
199. Neumann, J., Hofmann, B. & Gergs, U. Production and Function of Serotonin in Cardiac Cells. *Serotonin - Chem. Messenger Types Living Cells* (2017) doi:10.5772/intechopen.69111.
200. Song, P., Ramprasath, T., Wang, H. & Zou, M.-H. Abnormal kynurenine pathway of tryptophan catabolism in cardiovascular diseases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **74**, 2899–2916 (2017).

201. Campbell, B. M., Charych, E., Lee, A. W. & Möller, T. Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines. *Front. Neurosci.* **8**, (2014).
202. Nikolaus, S. *et al.* Increased Tryptophan Metabolism Is Associated With Activity of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **153**, 1504-1516.e2 (2017).
203. Gulaj, E., Pawlak, K., Bien, B. & Pawlak, D. Kynurenine and its metabolites in Alzheimer's disease patients. *Adv. Med. Sci.* **55**, 204–211 (2010).
204. Jacobs, K. R., Castellano-Gonzalez, G., Guillemin, G. J. & Lovejoy, D. B. Major Developments in the Design of Inhibitors along the Kynurenine Pathway. *Curr. Med. Chem.* **24**, 2471–2495 (2017).
205. Che, J. W., Kraft, A. R. M., Selin, L. K. & Welsh, R. M. Regulatory T cells resist virus infection-induced apoptosis. *J. Virol.* **89**, 2112–2120 (2015).
206. Banz, A., Pontoux, C. & Papiernik, M. Modulation of Fas-dependent apoptosis: a dynamic process controlling both the persistence and death of CD4 regulatory T cells and effector T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**, 750–757 (2002).
207. Fritzsching, B. *et al.* In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 32–36 (2005).
208. Winzler, C. *et al.* CD4(+) T regulatory cells are more resistant to DNA damage compared to CD4(+) T effector cells as revealed by flow cytometric analysis. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **79**, 903–911 (2011).

209. Winans, B. *et al.* Linking the aryl hydrocarbon receptor with altered DNA methylation patterns and developmentally induced aberrant antiviral CD8+ T cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 4446–4457 (2015).
210. Knubel, C. P. *et al.* 3-Hydroxykynurenine, a Tryptophan Metabolite Generated during the Infection, Is Active Against *Trypanosoma cruzi*. *ACS Med. Chem. Lett.* **8**, 757–761 (2017).
211. Silva, J. S. *et al.* Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* **175**, 169–174 (1992).
212. Wang, T., Wyrick, K. L., Pecka, M. R., Wills, T. B. & Vorderstrasse, B. A. Mechanistic exploration of AhR-mediated host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Int. Immunopharmacol.* **13**, 490–498 (2012).
213. Luebke, R. W. *et al.* Assessment of Host Resistance to *Trichinella spiralis* in Mice Following Preinfection Exposure to 2,3,7,8-TCDD. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **125**, 7–16 (1994).
214. DeKrey, G. K., Teagarden, R. E., Lenberg, J. L. & Titus, R. G. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Slows the Progression of Experimental Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible BALB/c and SCID Mice. *PLOS ONE* **8**, e76259 (2013).
215. Barroso, A. *et al.* The Aryl Hydrocarbon Receptor Modulates Production of Cytokines and Reactive Oxygen Species and Development of Myocarditis during *Trypanosoma cruzi* Infection. *Infect. Immun.* **84**, 3071–3082 (2016).
216. McMillan, B. J. & Bradfield, C. A. The aryl hydrocarbon receptor sans xenobiotics: endogenous function in genetic model systems. *Mol. Pharmacol.* **72**, 487–498 (2007).

217. Brant, F. *et al.* Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in the Immune Response Profile and Development of Pathology during *Plasmodium berghei* Anka Infection. *Infect. Immun.* **82**, 3127–3140 (2014).
218. Wu, H. Y. *et al.* In Vivo Induction of Tr1 Cells via Mucosal Dendritic Cells and AHR Signaling. *PLoS ONE* **6**, e23618 (2011).
219. Jankovic, D. *et al.* Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J. Exp. Med.* **204**, 273–283 (2007).
220. Anderson, C. F., Oukka, M., Kuchroo, V. J. & Sacks, D. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* **204**, 285–297 (2007).
221. O’Garra, A. & Vieira, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 425–428 (2007).
222. Sun, J., Madan, R., Karp, C. L. & Braciale, T. J. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat. Med.* **15**, 277–284 (2009).
223. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O’Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 683–765 (2001).
224. Trinchieri, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J. Exp. Med.* **204**, 239–243 (2007).

225. Saraiva, M. *et al.* Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity* **31**, 209–219 (2009).
226. Rodríguez-Sosa, M. *et al.* Over-production of IFN-gamma and IL-12 in AhR-null mice. *FEBS Lett.* **579**, 6403–6410 (2005).
227. Prlic, M., Lefrancois, L. & Jameson, S. C. Multiple choices: regulation of memory CD8 T cell generation and homeostasis by interleukin (IL)-7 and IL-15. *J. Exp. Med.* **195**, F49-52 (2002).
228. Kuo, C.-H. *et al.* Phthalates suppress type I interferon in human plasmacytoid dendritic cells via epigenetic regulation. *Allergy* **68**, 870–879 (2013).