



Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología,
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de
Córdoba.

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología
(CIBICI), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y
Técnicas (CONICET).

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Impacto de las Vías Wnt en la regulación de la
respuesta inmune y la inmunopatología durante
la infección con *Trypanosoma cruzi*”**

Prof. Bioq. Ximena Volpini

Directora de Tesis: Prof. Dra. Claudia Cristina Motrán

Córdoba, Argentina. 2019.

COMISIÓN ASESORA:

Prof. Dra. María Gabriela Paraje

Prof. Dr. José Luis Barra

Prof. Dr. Fabio Marcelo Cerbán

EVALUADORA EXTERNA:

Dra. Susana A. Laucella

El presente trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC), el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FONCyT).

Agradecimientos

Tabla de contenidos

Resumen	8
Abreviaturas y acrónimos	10
Introducción.....	15
La enfermedad de Chagas.....	16
Ciclo de vida del <i>T. cruzi</i>	17
Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas	20
Regulación de la respuesta inmune y control de la infección con <i>T. cruzi</i>	22
Reconocimiento del parásito por las células del sistema inmune innato.....	27
Reconocimiento de <i>T. cruzi</i> dependiente de receptores TLR.....	28
Reconocimiento de <i>T. cruzi</i> independiente de receptores TLR.....	29
Rol de los macrófagos en el control de la replicación de <i>T. cruzi</i> y en el desarrollo de inmunopatología.	29
Las vías de señalización Wnt.....	32
Vía de señalización Wnt / Ca ⁺⁺	34
Vía de señalización Wnt / β -catenina (canónica)	36
Diálogo entre la señalización dependiente de TLR y β -catenina	39
Rol de las vías de señalización Wnt en células del sistema inmune.....	40
Señalización Wnt en células dendríticas	41
Señalización Wnt en macrófagos	42
Señalización Wnt en células T CD4+.....	43
Señalización Wnt en células T CD8+.....	45
Participación de las vías Wnt en patologías	46
Formulación de la hipótesis.....	48
Justificación de la investigación.....	49
Objetivo General.....	50
Objetivo específico 1:.....	50
Investigar las vías de señalización Wnt que se activan durante la infección con <i>T. cruzi</i> e identificar los receptores celulares de tipo TLR y los mediadores solubles que participan en su activación:	50
Objetivo específico 2:.....	50
Evaluar la participación de las vías de señalización Wnt en el control de la replicación de <i>T. cruzi</i>	50
Objetivo específico 3:.....	50

Evaluar la participación de las vías de señalización Wnt en la modulación de la respuesta inmune protectora e inflamatoria durante la infección con <i>T. cruzi</i>	50
Resultados.....	51
Vías de señalización Wnt que se activan durante la infección con <i>T. cruzi</i> , receptores celulares de tipo TLR y mediadores solubles que participan en su activación	52
Participación de las vías de señalización Wnt en el control de la replicación de <i>T. cruzi</i>	67
Participación de la señalización Wnt en la modulación de la respuesta inmune protectora e inflamatoria durante la infección con <i>T. cruzi</i>	80
Conclusiones.....	89
Discusión	90
Materiales y Métodos	102
Referencias bibliográficas	117

Resumen

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, es la mayor causa de enfermedad cardíaca y de muertes por problemas cardiovasculares en áreas endémicas localizadas en América Latina. Cada año ocurren aproximadamente 12.000 muertes atribuidas a la severidad de la cardiopatía crónica ocasionada por la enfermedad de Chagas (CCC). Es bien aceptado 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 CCC. Las vías de señalización Wnt son esenciales para el desarrollo y diversos procesos biológicos. Se ha descrito que las proteínas Wnt son secretadas por macrófagos (Mo) y células dendríticas (CDs) luego de la señalización inducida por receptores TLR y citoquinas pro-inflamatorias. En estas células, la señalización mediada por Wnt / β -catenina (canónica) y Wnt / Ca^{++} está asociada a un perfil tolerogénico, la secreción de citoquinas anti-inflamatorias y la inducción de células T regulatorias (Treg). Además, en los últimos años se ha demostrado que las vías Wnt se encuentran involucradas en la regulación de procesos inflamatorios y que componentes de estas vías son modulados en una gran variedad de patologías cardíacas. En este trabajo de tesis se investigó el rol de las vías de señalización Wnt en la modulación de la respuesta inflamatoria / tolerogénica, el control de la replicación del parásito y el desarrollo de CCC. Se demostró que la infección por *Trypanosoma cruzi* induce la activación de las vías Wnt / β -catenina y Wnt / Ca^{++} en Mo y que esta activación es crítica para sostener la replicación parasitaria *in vitro*, ya que el tratamiento con inhibidores de la vía Wnt / β -catenina o de la secreción de proteínas Wnt limitó la replicación intracelular del parásito. La inhibición resultó en la activación de mecanismos que promueven el control de la replicación intracelular del parásito mediante la inducción de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, la activación de la enzimaIDO y la inhibición de la enzima arginasa. De manera similar, la inhibición farmacológica *in vivo* de la secreción de proteínas Wnt con IWP-L6, fue capaz de controlar la replicación del parásito y mejorar la supervivencia de ratones B6 infectados. Además, se demostró que el mismo tratamiento promueve la resistencia a la infección y modula la respuesta específica de tipo Th2, característica de ratones BALB/c, hacia una respuesta protectora de tipo Th1 a la vez que disminuye la función supresora de células Treg. Asimismo, Finalmente, el tratamiento *in vivo* con IWP-L6 previno el desarrollo de la patología cardíaca en los ratones BALB/c infectados. Los hallazgos de esta tesis contribuyen al entendimiento de mecanismos celulares que

orquestan diferentes señales que promueven una respuesta inmune efectiva capaz de restringir la replicación parasitaria y prevenir la inmunopatología cardíaca asociada a la enfermedad de Chagas crónica. Estos hallazgos contribuyen aportes para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para ser utilizadas solas o combinadas con otras drogas para el tratamiento de esta infección.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi, Enfermedad de Chagas, Wnt, β -catenina, respuesta inmune.*

Abreviaturas y acrónimos

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

AKT: del inglés *protein kinase B*

AMPC: del inglés *cyclic adenosine monophosphate*

ANOVA: análisis de la varianza, del inglés *analysis of variance*

APC: del inglés *Adenomatous polyposis coli*

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

Axin: Axina

BMM: macrófagos derivados de médula ósea del inglés, *bone marrow derived macrophages*

CAMKII: del inglés Ca^{++} / *Calmodulin-dependent protein kinase II*

CCC: cardiopatía crónica asociada a enfermedad de Chagas

CCR: del inglés *C-C chemokine receptor*

CD: del inglés *cluster differentiation*

CDs: células dendríticas

CFSE: del inglés *carboxyfluorescein succinimidyl ester*

CK1: del inglés *Casein kinase I*

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CMV: citomegalovirus

Cn: Calcineurina

CP: componente principal

CPA: célula presentadora de antígenos

CpG: citosina trifosfato seguida de guanidina trifosfato

CPK: del inglés *creatine phosphor-kinase*

CPK-MB: del inglés *creatine phosphor-kinase muscle/brain*

CREB: del inglés *cAMP response element-binding*

CXCR: del inglés *CXC chemokine receptor*

DAMPs: patrones moleculares asociados a daño

DMSO: di-metilsulfóxido

dpi: días post-infección

DSS: dextrán sulfato de sodio

Dvl: del inglés *Dishevelled*

ECG: electrocardiograma

ELISA: enzimo-inmunoanálisis, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*

ERN: especies reactivas del Nitrógeno

Foxp3: del inglés *forkhead box P3*

Fzd: del inglés *Frizzled*

GAPDH: del inglés *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GOT: del inglés *glutamic-oxaloacetic transaminase*

GPT: del inglés *glutamic-pyruvic transaminase growth factor β*

GSK-3 β : del inglés *Glycogen synthase kinase 3 is a serine/threonine protein kinase*

HIV: virus de la inmunodeficiencia humana

hpi: horas post-infección

HPV: virus del papiloma humano

IDO: del inglés *indoleamine 2,3-dioxygenase*

IFN: interferón

IgG1: inmunoglobulina-G1

IgG2a: inmunoglobulina-G2a

IL-x: interleucina

INF: infectado

iNOS: del inglés *inducible nitric oxide synthase*

Iono: ionomicina

ip: intra-peritoneal

IRF: factores reguladores de interferón, *del inglés interferon regulatory factor*

KO: deficiente genéticamente, del inglés *knock out*

LCMV: virus de la coriomeningitis linfocítica, del inglés *lymphocyte choriomeningitis virus*

LDH: del inglés *lactate dehydrogenase*

LEF: del inglés, *lymphoid enhancer-binding factor*

Li T: linfocito T

LPS: lipo-polisacáridos

LRP: receptores de lipoproteínas de baja densidad

Mo: macrófagos

MP: macrófagos peritoneales

MyD88: del inglés *myeloid differentiation primary response 88*

NFAT: del inglés *nuclear factor of activated T-cells*

NFATc1: del inglés *nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1*

NF-κB: del inglés *nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells*

NGS: técnicas de secuenciación de segunda generación, del inglés *Next Generation Sequencing*

NI: no infectado

NK: células asesinas naturales, del inglés *natural killer*

NOD: del inglés *nucleotide-binding oligomerization domain*

OMS: organización mundial de la salud

ON: óxido nítrico

PAMPs: del inglés *pathogen-associated molecular patterns*

PBS: del inglés *phosphate-buffered saline*

PCR: del inglés *polymerase chain reaction*

pi: post-infección

PI3K: del inglés *phosphatidylinositol 3-kinase*

PKA: del inglés *protein kinase A*

PMA: del inglés *phorbol 12-myristate 13-acetate*

PRRs: del inglés *pattern recognition receptors*

ROS: especies reactivas del Oxígeno, del inglés *reactive oxygen species*

RT-PCR: del inglés *real time polymerase chain reaction*

SBF: suero bovino fetal

SEM: error estándar de la media

Tbet: del inglés *T-box transcription factor TBX21*

TCF: del inglés *T-cell factor*

Tconv: célula T convencional

TCR: receptor del linfocito T, del inglés *T cell receptor*

Tfh: linfocitos T foliculares colaboradores, del inglés *T follicular helper*

TGF- β : factor de crecimiento transformante β , del inglés *transforming*

Th: linfocitos T colaboradores, del inglés *T helper*

Th1: linfocitos T colaboradores de la respuesta tipo 1, del inglés *T helper 1*

Th17: linfocitos T colaboradores de la respuesta tipo 17, del inglés *T helper 17*

Th2: linfocitos T colaboradores de la respuesta tipo 2, del inglés *T helper 2*

TLR: receptor de tipo Toll, del inglés *Toll-like receptor*

TNF: factor de necrosis tumoral, del inglés *tumor necrosis factor*

Tps: tripomastigotes

TrCP β : del inglés, *E3-ubiquitin ligase β -TrCP*

Treg: linfocitos T regulatorios

TRIF: del inglés *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-I*

VHB: virus de la hepatitis B

VHC: virus de la hepatitis C

VI: ventrículo izquierdo

Wg: del inglés *Wingless*

WT: salvaje, del inglés *wild type*

Introducción

La enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* está ampliamente distribuida en Centro y Sud América. Esta enfermedad es un problema sanitario prioritario en nuestro país, por la falta de una vacuna, de un tratamiento seguro y efectivo y por la presencia persistente del vector en el área endémica.

La patología causada por el parásito *T. cruzi* ha sido clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad emergente a nivel mundial, como la mayor enfermedad parasitaria de América y como una de las 13 enfermedades más desatendidas del mundo. Actualmente es considerada una endemia en América Latina, abarcando 21 países del territorio. Sin embargo, en las últimas décadas se ha detectado de forma creciente en Estados Unidos, Canadá y también en algunos países de Europa y del Oeste del Pacífico debido principalmente al flujo migratorio entre América Latina y el resto del mundo (Fig. 1).^{1,2}

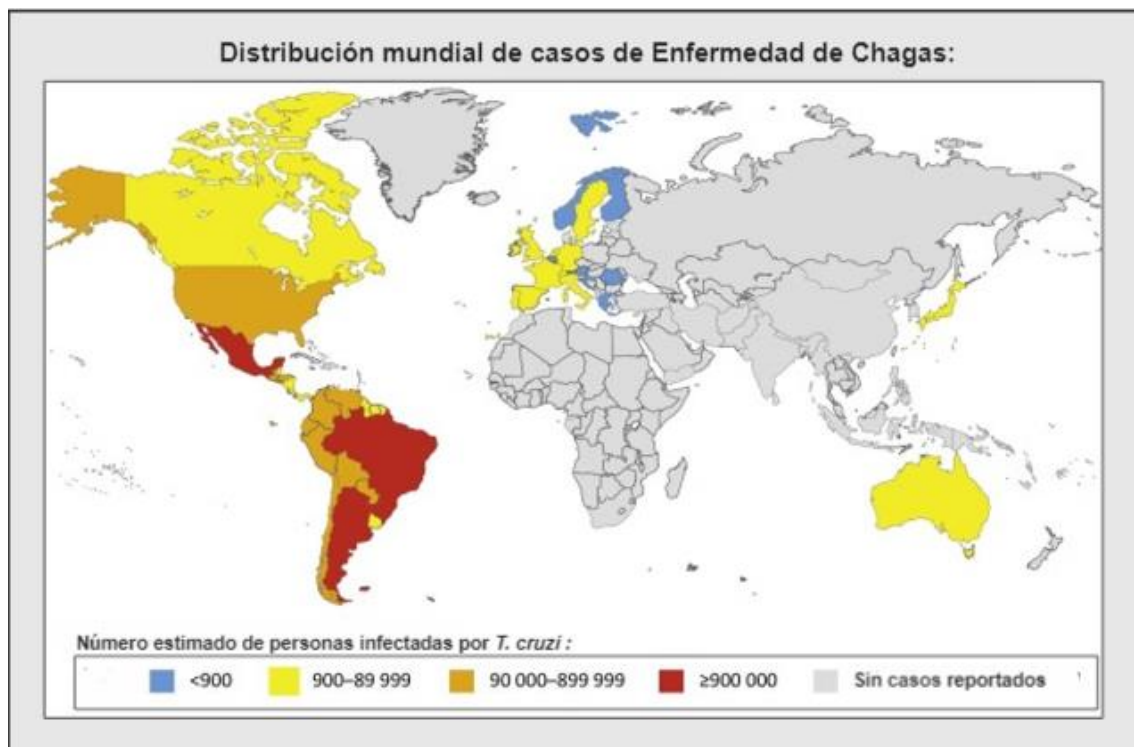


Figura 1 | Distribución mundial de casos de Enfermedad de Chagas.

Las áreas endémicas aún poseen alta prevalencia del insecto vector (rojo). La migración mundial desde áreas endémicas ha generado un incremento de incidencia de esta enfermedad en el mundo.

ADAPTADO DE: Perez, CJ. (2015). *Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health*. [Figura 1]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.006>

Se calcula que en el mundo hay alrededor de 7 millones de personas infectadas con *T. cruzi* y que más de 25 millones están en riesgo de adquirir la infección. En Argentina se estima que el 4% de la población está infectada y que un 30% de pacientes podría manifestar alteraciones cardíacas de distinto grado a lo largo de su vida. Además, hay un total de 15.000 nacimientos anuales sospechosos de Chagas vertical, de los cuales un 3% se confirma.^{2,3}

Ciclo de vida del *T. cruzi*

El parásito *T. cruzi* posee diversas formas y puede ser transmitido a humanos y a otras 150 especies de animales domésticos y salvajes. La forma infectiva tripomastigote y la forma replicativa intracelular amastigote, son las típicas formas del parásito identificadas en hospedadores, mientras que la forma replicativa epimastigote y la infectiva tripomastigote metacíclico son las formas identificadas en insectos vectores de la familia de los *Triatomínios*. Aunque más de 130 especies de triatomínos han sido identificados, sólo algunos son vectores para *T. cruzi*. Los más importantes en la transmisión del parásito a humanos son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*, siendo la primera especie la más prevalente en Sudamérica.⁴

Los triatomínos generalmente viven en las paredes y techos rajados de viviendas de construcción precaria de zonas rurales o áreas sub-urbanas. Normalmente, se esconden durante el día y se vuelven activos durante la noche cuando se alimentan de la sangre de vertebrados de sangre caliente en reposo. Usualmente, pican y defecan eliminando la forma metacíclica del parásito presente en su tracto digestivo. A través de la penetración cutánea, se exponen áreas de la piel a los parásitos depositados cerca de la picadura. Los parásitos penetran la herida e ingresan al torrente sanguíneo bajo la forma infectiva tripomastigote cuando el vertebrado frota instintivamente las heces de los insectos sobre la zona de la picadura, los ojos, mucosas o cualquier herida abierta cercana de la piel. La penetración de tripomastigotes infectivos a través de la mucosa intacta del ojo, conduce a una reacción indolora de la conjuntiva con edema unilateral de ambos párpados y linfadenitis de los ganglios pre-auriculares (signo de Romana), mientras que una picadura en cualquier otra parte de la piel puede provocar una reacción en el tejido subcutáneo con edema e induración local, congestión vascular e infiltración celular (chagoma de inoculación) (Fig. 2A).

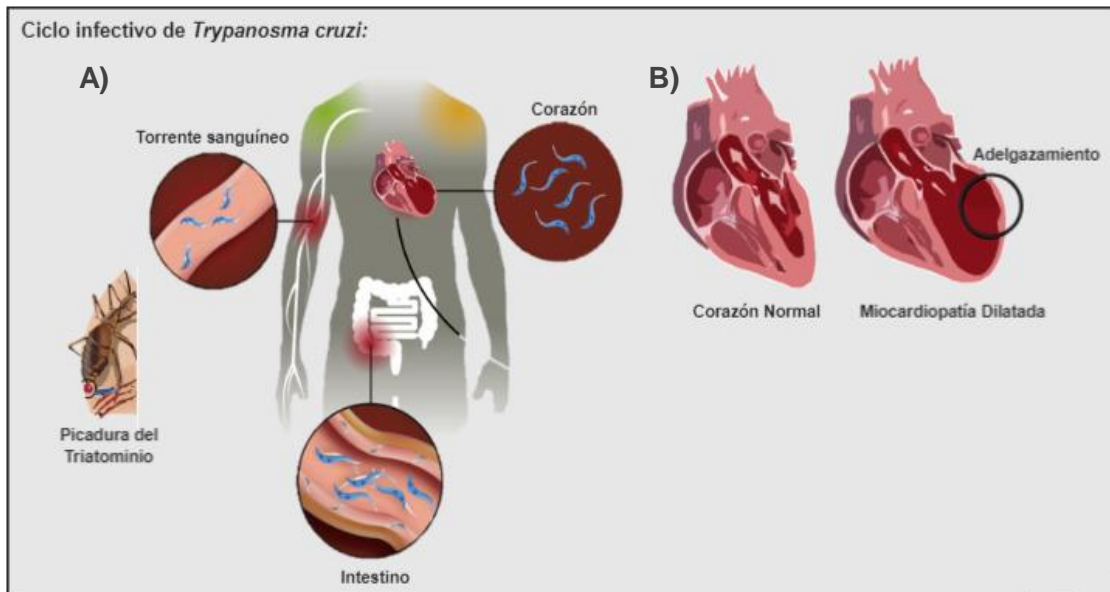


Figura 2 | Ciclo de vida de *T. cruzi*.

A) Luego de la picadura, el triatominio infectado deposita sus heces que contienen la forma metacíclica del parásito. La forma infectiva del parásito ingresa al torrente sanguíneo de un vertebrado de sangre caliente luego de la penetración cutánea inducida principalmente por frotación de la herida. Los parásitos se diseminan hacia los órganos por los cuales tienen tropismo, afectando principalmente a células musculares. **B)** La principal complicación inducida por la persistencia del parásito en conjunto con la respuesta inmune desencadenada, es la cardiopatía asociada a la Enfermedad de Chagas crónica (CCC). Como consecuencia, la aparición combinada de áreas focales de inflamación, necrosis y fibrosis del miocardio generalmente resultan en anomalías en la contracción de la pared segmentaria del ventrículo izquierdo, un marcador clave de la CCC.

Los parásitos se distribuyen en las células del hospedador, los macrófagos son una de las primeras poblaciones infectadas y tienen además un marcado tropismo por células musculares lisas, esqueléticas y cardíacas. En dichas células escapan de la vacuola parasitófora y se liberan en el citoplasma. Los tripomastigotes se transforman en amastigotes esféricos que comienzan la replicación por fisión binaria hasta saturar la célula y producir su lisis, momento en el que se transforman nuevamente en tripomastigotes. Los tripomastigotes invaden tejidos adyacentes y se diseminan a través de los vasos linfáticos y sanguíneos hasta sitios distantes en donde comienzan ciclos adicionales de multiplicación intracelular.^{1,2}

Otras formas de transmisión del parásito incluyen la transfusión sanguínea, el trasplante de órganos sólidos, la transmisión vertical/congénita, oral y trabajo-accidental. La transmisión por lactancia aún está siendo estudiada. Si bien la transmisión vectorial es la importante en áreas endémicas, las formas transfusional y congénita son las formas de infección humana más prevalentes en zonas urbanas y en regiones no-endémicas. La infección por ingesta oral de líquidos o comida contaminados con *T. cruzi* y por

accidentes laborales son menos frecuentes; sin embargo, la primera está asociada a una infección parasitaria masiva que resulta en una presentación clínica aguda más severa y con alta mortalidad.⁴

Durante la etapa aguda de la infección, todos los tipos de células nucleadas en el hospedador son objetivos potenciales para la infección con *T. cruzi*. Con el transcurso del tiempo y con el desarrollo de la respuesta inmune, la cantidad de parásitos en sangre se reduce y el número de parásitos en los tejidos disminuye sustancialmente, lo que indica el final de la “fase aguda” y el comienzo de la “fase crónica” de la infección. Sin embargo, dado que el parásito no se elimina por completo, la infección persiste por tiempo indefinido durante toda la vida⁵ (Fig. 3).

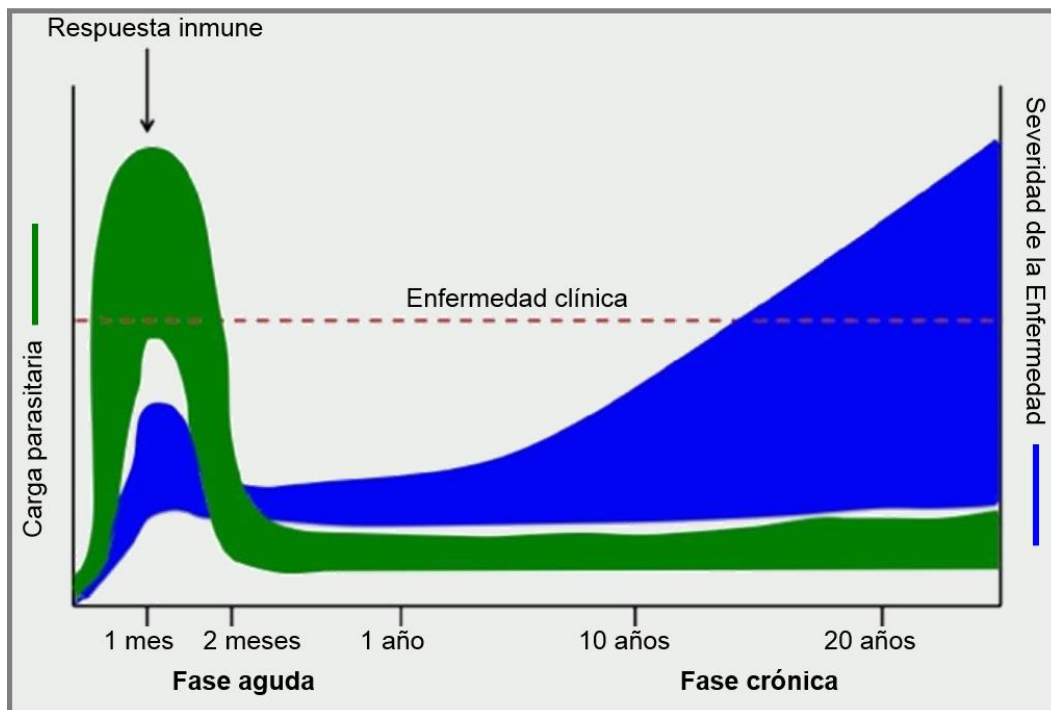


Figura 3 | Desarrollo de la respuesta inmune luego de la infección con *T. cruzi*.

Con el transcurso del tiempo y con el desarrollo de la respuesta inmune, la cantidad de parásitos en sangre se reduce y el número de parásitos en los tejidos disminuye sustancialmente, lo que indica el final de la fase aguda y el comienzo de la fase crónica de la infección. Dado que el parásito no se elimina por completo, la infección de tejidos específicos persiste por tiempo indefinido durante toda la vida y dependiendo de la seriedad de la patología causada, induce el desarrollo o no de enfermedad clínica.

ADAPTADO DE: Chatelain, E. (2015). *Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review*. [Figura 1]. DOI: 10.2147/DDDT.S90208.

Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas

La heterogeneidad en las diversas cepas de *T. cruzi* ha sido ampliamente estudiada por métodos biológicos, bioquímicos y moleculares, para intentar explicar las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas y las diferencias geográficas en la morbilidad y mortalidad inducidas por esta patología.

La fase inicial de la infección por *T. cruzi* en humanos tiene una duración de entre 4 y 8 semanas. La fase aguda de la infección es asintomática y se resuelve espontáneamente en aproximadamente el 90% de las personas, incluso sin tratamiento. En otros casos, los síntomas aparecen entre la primera y segunda semana posterior a la infección, presentándose como una enfermedad febril auto-limitada, malestar, agrandamiento del hígado, del bazo y los ganglios linfáticos; edema subcutáneo (localizado o generalizado); y en el caso particular de la transmisión vectorial, los signos del portal de entrada como el chagoma de inoculación o signo de Romaña. En estos casos los registros electrocardiográficos muestran taquicardia sinusal, bloqueo aurículo-ventricular de primer grado, voltaje QRS bajo o cambios primarios de la onda T; y mediante radiografía de tórax se pueden observar grados variables de cardiomegalia. La muerte puede ocurrir ocasionalmente en la fase aguda (<5-10% de los casos sintomáticos) como resultado de una miocarditis grave, de una meningoencefalitis o la combinación de ambas.⁶

Una mujer infectada puede transmitir la infección al feto en cualquier etapa de la enfermedad. En la infección congénita los síntomas más comunes que pueden ser aparentes al nacer, o desarrollarse semanas después del parto, son hipotonicidad, fiebre, hepato-esplenomegalia y anemia. Otros hallazgos incluyen prematuridad y bajo peso al nacer. Manifestaciones graves, incluyendo miocarditis, meningoencefalitis, y neumonitis son menos frecuentes pero elevan el riesgo de muerte.⁶

Alrededor del 60-70% de los individuos infectados no desarrollan enfermedad clínica aparente. Estos pacientes poseen la forma indeterminada de la enfermedad de Chagas crónica que se caracteriza por la positividad para anticuerpos contra *T. cruzi* en suero, electrocardiograma (ECG) normal e imágenes radiológicas normales de tórax, esófago y colon. El 30-40% restante de los individuos infectados desarrolla una forma de enfermedad crónica con complicaciones cardíacas, digestivas (mega-esófago y mega-colon) o cardio-digestivas entre 10 y 30 años después de la infección inicial, mientras que la progresión directa desde la fase aguda hacia la forma clínica de la enfermedad de

Chagas se ha registrado sólo en algunos pacientes (5-10%). Además, la reactivación de la enfermedad de Chagas también puede ocurrir en pacientes con infección crónica que se encuentran inmunológicamente comprometidos o que están recibiendo tratamiento con drogas inmunosupresoras.

La forma digestiva prevalece casi de forma exclusiva en Argentina, Brasil, Chile y Bolivia, y es rara en el norte de América del Sur, América Central y México. Se cree que esta distribución geográfica se debe a diferencias en las cepas de parásitos. La disfunción gastrointestinal (principalmente mega-esófago, mega-colon o ambas) se desarrolla en aproximadamente 10-15% de los pacientes con infección crónica.⁶

La forma cardíaca es la manifestación más grave y frecuente de la enfermedad de Chagas crónica en nuestro país.⁷ Se desarrolla en un 20-30% de individuos y típicamente presenta anomalías del sistema de conducción cardíaco, bradiarritmias y taquiarritmias, aneurismas apicales, insuficiencia cardíaca, tromboembolismo y muerte súbita. Las anomalías más comunes en el ECG son bloqueo de rama derecha, extrasístole ventricular, prolongación del segmento PR, cambios en la onda T, prolongación del intervalo QT, bloqueo fascicular anterior izquierdo, contracciones ventriculares prematuras, ondas Q anormales y disminución del voltaje en el complejo QRS. La combinación de bloqueo de rama derecha y de bloqueo fascicular anterior izquierdo es típico en la enfermedad de Chagas cardíaca (CCC). La insuficiencia cardíaca a menudo es una manifestación tardía de la CCC. La insuficiencia cardíaca izquierda aislada puede estar presente en las primeras etapas de la afectación de este órgano. Estudios recientes sobre la infección crónica con *T. cruzi* en humanos han demostrado que, en etapas tempranas, la aparición combinada de áreas focales de inflamación, necrosis y fibrosis del miocardio generalmente resultan en la aparición de anomalías del movimiento de la pared segmentaria del ventrículo izquierdo (VI), un marcador clave de la CCC (Fig. 2B). En etapas avanzadas de la enfermedad la insuficiencia es bi-ventricular con un predominio del lado derecho que provoca edema periférico, hepatomegalia y ascitis más prominentes que la congestión pulmonar. Esta patología cardíaca se asocia con una mortalidad más elevada que la insuficiencia cardíaca por otras causas. Las embolias sistémicas y pulmonares que surgen de los trombos murales en las cámaras cardíacas son bastante frecuentes. La muerte súbita es la principal causa de muerte en pacientes con CCC y representa casi dos tercios de todas las muertes asociadas a enfermedad de Chagas, seguida de la insuficiencia cardíaca refractaria (25-30%) y el tromboembolismo (10-

15%). La muerte súbita por falla cardíaca puede ocurrir incluso en pacientes que anteriormente eran asintomáticos. Por lo general, se asocia con taquicardia ventricular y fibrilación o, en menor frecuencia, con bloqueo aurículo-ventricular completo o disfunción del nódulo sinusal. Las principales causas de muerte varían dependiendo de la etapa de la enfermedad, con un claro predominio de la muerte súbita en etapas tempranas, y un ligero predominio de la muerte por insuficiencia cardíaca en etapas avanzadas.^{8,9}

La patogénesis de las lesiones en miocardio ha sido motivo de intensos debates y diferentes hipótesis. Actualmente, es bien aceptado que la persistencia del parásito en conjunto con la excesiva respuesta inmune inflamatoria generada por la infección, cumplen un rol fundamental en el desarrollo de la patología cardíaca. Respecto a las causas del daño tisular se ha propuesto que es debido en sumatoria al efecto directo del parásito *per se*, el efecto lesivo de la respuesta inmune generada contra antígenos parasitarios que comparten homología con antígenos del hospedador (mimetismo molecular) e incluso a la generación de respuesta autoinmune gatillada por la intensa activación policlonal inducida por la infección.¹⁰ Sin embargo, aún se desconoce qué determina que un paciente desarrolle CCC y otros permanezcan asintomáticos el resto de su vida.

El estudio del curso de la infección en diferentes cepas de ratones ha demostrado que diferentes individuos pueden presentar una mayor susceptibilidad a la infección o a la inmunopatología asociada a la infección con este protozoario. Así, los ratones de la cepa B6 a pesar de ser más resistentes a la infección que los ratones BALB/c, presentan una alta mortalidad debido a la toxicidad ocasionada por un desbalance entre mediadores pro- y anti-inflamatorios¹¹, por lo que no se descarta al componente genético en el desarrollo de patología luego de esta infección.

Regulación de la respuesta inmune y control de la infección con *T. cruzi*

La inmunidad innata juega un papel crucial en la resistencia del hospedador contra las infecciones actuando como primera barrera en la defensa para controlar contra la invasión de patógenos. Las principales células de la inmunidad innata son las células dendríticas (CDs) y los macrófagos. Las CDs y macrófagos son células presentadoras de antígeno (CPAs) profesionales que actúan como un puente entre las respuestas de la inmunidad innata y la adaptativa, participando en la activación y diferenciación de las células T a

células efectoras y de las células B a células productoras de anticuerpos. Además, mientras las CD₄ poseen un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis inmune, los macrófagos son células críticas para el control de diversas infecciones. Otro grupo importante dentro del sistema inmune innato son las células NK que cumplen un rol crítico principalmente en la respuesta inmune contra virus y tumores.

Dentro de las células que componen la inmunidad adaptativa, las células T CD₄⁺ son cruciales para lograr una respuesta adecuada contra los patógenos. Las células T CD₄⁺ denominadas también cooperadoras (Th, por sus siglas en inglés) se activan a través de su receptor antigénico (TCR) con péptidos presentados en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH-II) por CPAs (señal 1) en presencia de moléculas co-estimuladoras y citoquinas (señal 2). Según las características de la señal 2, las células Th, pueden diferenciarse en subtipos de células efectoras que se caracterizan por su capacidad diferencial para producir citoquinas y promover distintos tipos de respuestas inmunes. Así, la activación de las células Th0 (denominadas así por estar no tener un fenotipo Th particular) en presencia de IL-12 e IFN- γ induce la expresión del factor de transcripción T-bet y promueve el desarrollo de las células Th1 que se caracterizan por la producción de IFN- γ y TNF. Estas células colaboran con la activación de macrófagos para la eliminación de los microorganismos intracelulares y el IFN- γ participa además en la activación de las células B para promover la producción de anticuerpos.¹² La activación de las células Th0 en presencia de IL-4, induce la expresión del factor de transcripción GATA-3 característico de las células Th2, muy importantes en la respuesta contra parásitos helmintos. Estas células producen IL-4, IL-5 e IL-13 que activan y expanden la respuesta de mastocitos y eosinófilos e inducen el desarrollo de Mo que participan de la reparación de tejidos. La activación de las células Th0 en presencia de IL-6 e IL-1 β o TGF- β en ratón induce la expresión del factor de transcripción ROR- γ t y la diferenciación de células Th17 que secretan IL-17, IL-21 e IL-22, son críticas en la inmunidad de las mucosas y están involucradas en la respuesta inmune contra bacterias extracelulares y hongos. Las células Tfh se diferencian en presencia de IL-6 e IL-21, expresan el factor de transcripción Bcl-6 y son críticas en la activación de células B, la producción de anticuerpos y la formación de centros germinales. Las células Treg que se generan en presencia de TGF- β e IL-2 expresan el factor de transcripción Foxp3 y el receptor de alta afinidad para IL-2 CD25, modulan la respuesta inmune ya que su rol principal es el mantenimiento de la homeostasis por su capacidad de limitar las respuestas excesivas de

células Th1, Th2 y Th17. las Treg producen IL-10 y TGF- β , y utilizan otros diferentes mecanismos como la molécula CTLA-4 para inhibir la función de las CPAs.¹³

Otras células muy importantes en la inmunidad adaptativa son las células T CD8+. Estas células reconocen péptidos antigénicos presentados por las CPAs en el contexto del CMH-I y participan en la eliminación de células infectadas. Las funciones efectoras de estas células son llevadas a cabo mediante la liberación de granzimas y perforinas que producen la lisis celular y además participan en la activación de Mo a través de la secreción de IFN- γ .

A pesar de la intensa investigación experimental desarrollada, los mecanismos utilizados por el hospedador para controlar la infección por *T. cruzi* durante la etapa aguda de la infección aún no han sido totalmente dilucidados. Diferentes moléculas presentes en la célula hospedadora y en la superficie del parásito son esenciales para el proceso activo de la invasión celular y algunos componentes parasitarios son capaces de estimular la respuesta inmune.

La invasión de una célula hospedadora por *T. cruzi* implica el reclutamiento y la fusión de lisosomas en el sitio de invasión del parásito para formar la vacuola parasitófora. Este proceso se produce mediante dos estrategias diferentes que están mediadas por la generación de inositol-trifostato (IP3) y por el aumento de Ca⁺⁺ intracelular, o alternativamente por activación de la fosfoinositol-3-kinasa (PI3K). Sin embargo, unas horas después de la entrada a la célula hospedadora, el parásito escapa de la vacuola parasitófora hacia el citosol, donde se diferencia a la forma amastigote e inicia su replicación.^{14,15} En el citosol, los antígenos de *T. cruzi* están disponibles en grandes cantidades favoreciendo el procesamiento y la presentación antigénica llevada a cabo a través de la vía endógena y exógena por CMH-I y CMH-II para la presentación a células T CD8+ y CD4+, respectivamente.¹⁶

En la etapa inicial de la invasión de *T. cruzi* las células del sistema inmune innato poseen un rol crucial en la resistencia a la infección, ya que la activación de la inmunidad innata es necesaria tanto para iniciar una respuesta de células T, como para el reclutamiento de estas células en los tejidos infectados. Las CDs y macrófagos infectados por *T. cruzi* son activados por los PAMPs presentes en el parásito que se unen a receptores de la inmunidad innata como los receptores de tipo Toll (TLR) y de tipo NOD (NLR).¹⁷ Además de actuar como células hospedadoras, las CDs producen cantidades de IL-12

mientras macrófagos producen además TNF. Estas citoquinas activan a células NK productoras de IFN- γ . En conjunto, esta respuesta favorece la diferenciación de células T CD4+ precursoras (Th0) hacia el fenotipo Th1, activa a células CD8+ citotóxicas y promueve la respuesta de anticuerpos.⁴ El IFN- γ producido por las células NK, Th1 y CD8+ perpetúa a su vez la activación de Mo. Los macrófagos activados incrementan la actividad de las enzimas indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO) y óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), productoras de kinureninas (kyn) y óxido nítrico (ON) respectivamente. Estos metabolitos son tóxicos para el parásito y son los principales efectores de la muerte de los parásitos intracelulares en Mo.¹⁸⁻²⁴ Las células T CD8+ citotóxicas eliminan células infectadas y los anticuerpos participan en la eliminación de los tripomastigotes extracelulares mediante la opsonización y la fijación de complemento²⁵ (Fig. 4).

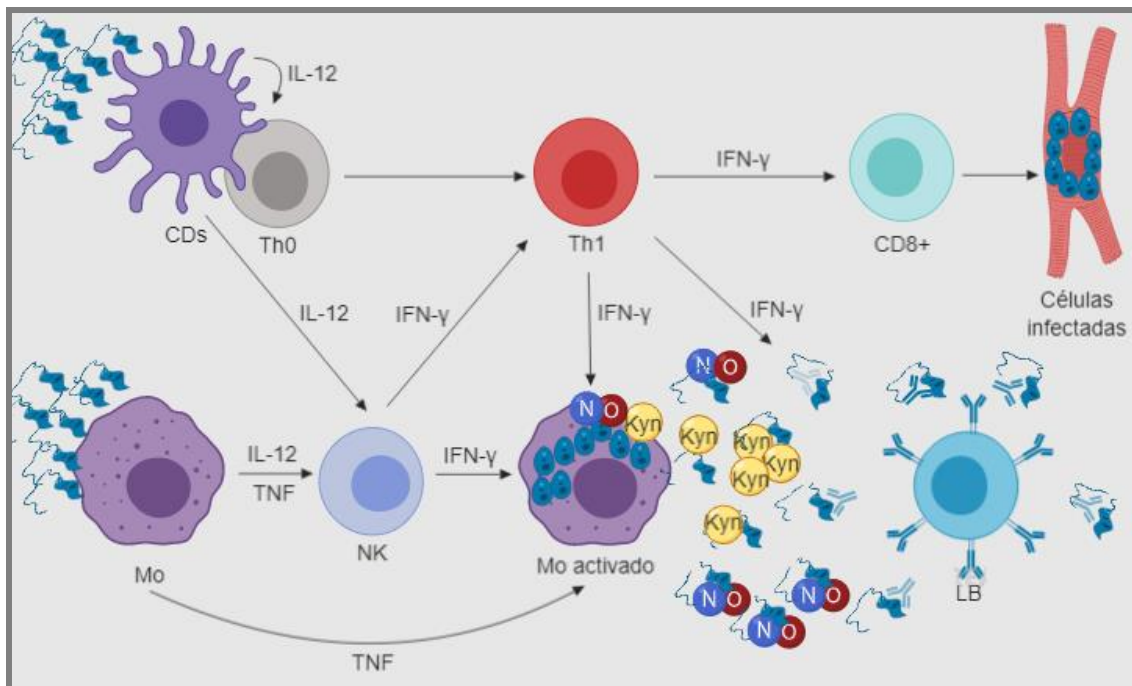


Figura 4 | Principales células y mediadores solubles involucrados en la respuesta inmune durante la infección por *T. cruzi*.

Una de las características inmunológicas de la infección por *T. cruzi*, es la inducción de una respuesta polarizada hacia un perfil Th1 fuerte y persistente que se asocia con inmunidad protectora contra el parásito.^{15,26,27} Sin embargo, cuando la respuesta Th1 no es convenientemente controlada puede participar en mecanismos de daño tisular y fibrosis. Así, altos niveles de ON, IFN- γ y TNF en suero y gran número de células T

CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN- γ han sido asociados con la patogenia de la enfermedad de Chagas crónica.^{4,26-28}

Uno de los mecanismos más importantes para limitar la respuesta de tipo Th1 exacerbada es la inducción de células Treg. Sin embargo, el rol de las células Treg en la infección experimental con *T. cruzi*, es bastante controvertido ya que algunos han reportado para estas células un rol protector limitado, mientras que otros le adjudican un rol deletéreo e inclusive irrelevante durante esta infección.²⁹⁻³² Los ratones C57BL/6 (B6) infectados con *T. cruzi* desarrollan un perfil de respuesta principalmente Th1 y no expanden la población de células Treg lo cual resulta en una gran dificultad para controlar la respuesta inflamatoria. En esta cepa de ratones el órgano blanco de la inmunopatología es el hígado, y su muerte prematura es principalmente consecuencia de falla hepática.^{11,33} En contraste, los ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* desarrollan un perfil de respuesta polarizado preferentemente hacia Th2 y expanden la población de células Treg lo cual resulta en un incremento de la relación Th2/Th1, una disminución en la relación Th1/Treg y el desarrollo de la respuesta inmune ineficiente para controlar la replicación del parásito.³³ En esta cepa el órgano blanco de la infección es el corazón, y su muerte se produce a causa de la imposibilidad de controlar la infección en combinación con el desarrollo de patología cardíaca. Estos datos indican que investigar la respuesta a la infección por *T. cruzi* en ambas cepas de ratones, ayuda a abordar los diferentes grados de susceptibilidad y la heterogeneidad del curso de la enfermedad clínica en humanos que resulta de la persistencia del parásito y de factores propios del huésped. De manera interesante, los pacientes con CCC muestran menores niveles de células T CD4⁺ que producen IL-10¹ y células T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺^{2,3} que los que permanecen asintomáticos, sugiriendo para esta población un rol modulador de la inmunopatología cardíaca en humanos. Por otro lado, recientemente Araujo y col.²⁹ han reportado que en la infección de ratones B6 con *T. cruzi*, el limitado desarrollo de la población Treg es crítica para permitir la activación y expansión de la respuesta protectora T CD8⁺.

En resumen, la reacción inflamatoria provocada por *T. cruzi* que involucra además de la activación de las células del sistema inmune innato y adaptativo la producción de citoquinas y quimiocinas por fibroblastos, células endoteliales y cardiomiocitos, es muy importante para el control de infección. Sin embargo, pero su ineficiente regulación participa en los mecanismos de daño tisular ocasionados por el intenso infiltrado inflamatorio, la lisis de los cardiomiocitos, el desarrollo de fibrosis y la progresión a CCC

(Fig. 2B). Teniendo esto en cuenta, se considera que durante la infección con *T. cruzi* es necesario que el hospedador establezca con una cinética precisa, una primera etapa de respuesta inflamatoria esencial para que se produzca una rápida y efectiva eliminación del parásito, y una segunda etapa de activación de circuitos regulatorios capaces de controlarla, limitando así el daño tisular producido por la excesiva reacción inflamatoria.

Reconocimiento del parásito por las células del sistema inmune innato.

La eliminación temprana de microorganismos invasores es la función principal de la inmunidad innata. Los macrófagos y las CDs son células especializadas que pueden reconocer rastros de componentes microbianos y montar una defensa inmune temprana. Además, estas células también tienen un rol importante en la inducción de la inmunidad adquirida.

Para reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o daño (DAMPs), las células de la inmunidad innata expresan diversas familias de receptores que incluyen receptores NOD (NLR), receptores de lectina tipo C (CLR), receptores tipo RIG (RLR) y receptores tipo Toll (TLR). Los TLR son los principales receptores que participan del reconocimiento y respuesta contra microorganismos, y desencadenan respuestas que promueven el reclutamiento de fagocitos en el tejido infectado y la muerte del patógeno invasor. Sin embargo, cuando se activan en exceso estos receptores pueden mediar la inducción de daño. Hasta la fecha, los TLR han sido implicados en la defensa contra todos los tipos de microorganismos que causan enfermedades humanas, incluidos los parásitos protozoarios.³⁵ De tal modo, son mediadores centrales de la activación inmune innata durante la infección con *T. cruzi*.

Las células del sistema inmune innato cumplen un papel fundamental en al menos dos aspectos importantes de la infección con *T. cruzi*: por un lado, participan del control de la replicación del parásito y de la diseminación de éste en los tejidos del hospedador; y por el otro, participan en la reacción inflamatoria en los tejidos infectados, que como se describió anteriormente es una de las causas del daño tisular y de la disfunción orgánica durante esta enfermedad. Así, las citoquinas como IL-12, TNF y el IFN- γ y las especies reactivas del nitrógeno (ERN) son importantes tanto en la resistencia durante las primeras etapas de la infección como en el desarrollo de miocarditis⁷, resaltando la importancia del sistema inmune innato en esta patología.^{26,34}

Reconocimiento de *T. cruzi* dependiente de receptores TLR.

La familia de TLR está compuesta por 11 y 13 miembros en humanos y ratón, respectivamente. Las principales moléculas microbianas que activan dichos receptores se han identificado como componentes de la pared celular o la membrana de las bacterias: TLR2 y TLR1 se activan por lipopéptidos tri-acilados; TLR2 y TLR6 por lipopéptidos di-acilados; TLR4 por lipopolisacáridos (LPS); y TLR5 por flagelina. Además, los ácidos nucleicos de virus y bacterias también se han identificado como agonistas de TLRs; por ejemplo, TLR3 se activa por ARN viral de doble cadena, TLR7 y TLR8 por ARN de simple cadena, y TLR9 por ADN con motivos CpG no-metilados. Los TLR comparten un dominio citoplásmico de alta homología con el receptor de IL-1 (IL-1R), conocido como dominio TLR / IL-1R (TIR) y no pueden señalizar sin un dominio TIR intacto. La señalización a través de TLR activa la vía de NF- κ B (factor nuclear κ B) y la del factor regulador de interferones (IRF) utilizando diferentes moléculas adaptadoras como MyD88, TRIF, TRAM1, TIRAP.³⁵

Diferentes grupos han estudiado la presencia de ligandos de TLR en *T. cruzi* que son reconocidos por macrófagos y CDs. El grupo de Gazinelli reportó en 2001 que miembros de una gran familia de mucinas presentes en la superficie de tripomastigotes (GPI por glycosylfosfatidylinositol) son ligandos de TLR2 e inducen la secreción de IL-12, TNF, NO y TNF en Mo.³⁶ Posteriormente se demostró que la proteína Tc52 de *T. cruzi* activa CDs a través de TLR2³⁷ y que el complejo formado por CD14, TLR4 y MD2 es crucial para la activación de Mo y para la actividad pro-inflamatoria mediada por glycoinositolfosfolípido (GIPL)-ceramida.⁴

TLR9 reconoce motivos CpG-ADN de *T. cruzi* y estimula la producción de IL-12, ON y TNF en Mo activados por IFN- γ ³⁸ mientras que ARN de *T. cruzi* es reconocido por el receptor TLR7.⁴ Durante la infección con *T. cruzi*, los TLR que reconocen sus componentes emplearían MyD88 y TRIF como moléculas adaptadoras. MyD88 y Mal/TIRAP son necesarios para la activación de NF- κ B por TLR2 y TLR4, y de manera independiente de MyD88, TRIF y TRAM participan en la señalización por TLR4 activando IRF3. TLR7 y TLR9 activan NF- κ B y e IRF7 a través de MyD88. La activación de NF- κ B conduce a la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- α e IL-12, mientras que los IRF son necesarios para la transcripción de genes de interferones tipo I (α y β) (Revisado por Junqueira y col.⁴).

Reconocimiento de *T. cruzi* independiente de receptores TLR

Se conoce poco sobre la participación de receptores de la inmunidad innata diferentes de los TLR en el reconocimiento de *T. cruzi*. En general la activación en forma independiente de TLR está ligada a la producción de interferones. *T. cruzi* induce la secreción de IFN- β mediante una vía de señalización que involucra a TKB1 (del inglés TANK-binding kinase 1) e IRF3 mientras que el incremento de Ca⁺⁺ intracelular en las células infectadas es responsable de la activación de la vía de señalización calcineurina-NFATc1 llevando a la producción de IFN- γ .⁴

Respecto de otros PRR que participan en el reconocimiento de *T. cruzi*, se ha demostrado que ratones deficientes en NOD1 (NLR que reconoce péptidos glicanos) son muy susceptibles a la infección con *T. cruzi*, a pesar de que la deficiencia de este receptor no modifica su capacidad para producir IL-12, TNF, IFN- γ , o IL-10. Así, el mecanismo mediante el cual la expresión de NOD1 contribuye a la resistencia en esta infección no está del todo dilucidado ya que este parásito no contiene péptidos glicanos o algún otro ligando conocido de NOD1 por lo que se desconoce si NOD1 realmente participa en el reconocimiento de *T. cruzi* o es una vía importante que se activa en forma indirecta.³⁹

Por otro lado, cruzipaina, la principal cisteína proteasa de *T. cruzi*, es capaz de inducir la maduración de CDs a través de la activación del receptor de bradiquinina de tipo B2 (B2R).⁴⁰

Rol de los macrófagos en el control de la replicación de *T. cruzi* y en el desarrollo de inmunopatología.

Los macrófagos son células terminalmente diferenciadas del sistema mononuclear fagocítico que desempeñan un papel indispensable en el mantenimiento de la homeostasis y en la defensa del organismo. Según el microambiente y las condiciones de activación, este tipo celular puede modificar su fenotipo y función, presentando una gran plasticidad que explica su función protectora y potencialmente perjudicial durante procesos de inflamación crónica y de lesión tisular. La nomenclatura Th1 y Th2 empleada para células T cooperadoras, se ha proyectado en macrófagos para reflejar el perfil de respuesta que son capaces de inducir. Así macrófagos que polarizan respuestas inmunes hacia un perfil

Th1 se denominan M1 o clásicamente activados, mientras que los macrófagos que polarizan hacia un perfil Th2 se denominan M2 o alternativamente activados.⁴¹

El perfil de "activación clásica" (M1) se produce en un entorno de citoquinas de tipo Th1 (IFN- γ , TNF) o luego del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por los TLR. Los macrófagos M1 desempeñan un rol fundamental en la protección contra patógenos al producir altos niveles de TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-12 y bajos niveles de IL-10. Además, estas células presentan importante actividad de las enzimas iNOS y ciclo oxigenasa (COX-2) y ejercen funciones anti-proliferativas y citotóxicas debido a la producción de ERN y oxígeno como ON, peroxinitrito, peróxido de hidrógeno y superóxido. Así, los macrófagos M1 contribuyen a la resistencia contra parásitos intracelulares y tumores⁴¹ (Fig. 5).

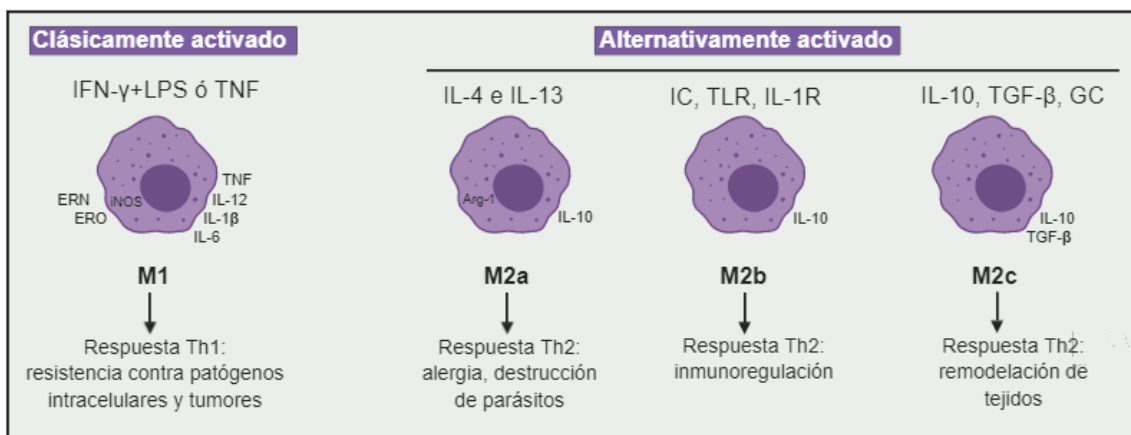


Figura 5 | Polarización de macrófagos.

Los macrófagos se polarizan en respuesta al microambiente y adquieren diferentes funciones. IC: inmuno-complejos, GC: glucocorticoides, ERN: especies reactivas del nitrógeno, ERO: especies reactivas del oxígeno.

ADAPTADO DE: Mantovani, A. (2004). *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. [Figura 3]. DOI: 10.1016/j.it.2004.09.015.

Las citoquinas de tipo Th2 (IL-10, IL-4 e IL-13) y los estímulos pro-apoptóticos promueven el desarrollo de un fenotipo de macrófagos denominados anti-inflamatorios o "alternativamente activados". Los macrófagos M2 expresan receptores de manosa y secretan altos niveles de las citoquinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- β en comparación con los M1. A su vez, los macrófagos M2 se subdividen en diferentes subtipos: M2a o pro-fibróticos inducidos por IL-4 o IL-13, M2b activados por inmunocomplejos en combinación con IL-1 β o LPS y M2c regulatorios inducidos por IL-10, TGF- β o glucocorticoides. Los macrófagos M2, además de participar en las respuestas polarizadas hacia un perfil Th2, promueven la destrucción de parásitos intracelulares, están asociados

a la progresión de tumores, favorecen la remodelación de tejidos y tienen funciones inmuno-reguladoras (Fig. 5).⁴²

Dentro de las primeras células que *T. cruzi* infecta y por las cuales posee tropismo, se encuentran los macrófagos.^{43,44} Éstos juegan un rol importante en la infección, ya que participan como células hospedadoras y, a su vez, como células efectoras contra el parásito ya que pueden ser instruidas para activar mecanismos efectoras que controlan la infección.⁹⁴

La capacidad de macrófagos para mediar la actividad microbicida contra los amastigotes intracelulares es iniciada por el reconocimiento del patógeno y por el IFN- γ producido por células Th1, NK y T CD8+. Entre los genes regulados por IFN- γ están las enzimas iNOS e IDO, ambas muy importantes en el control de la replicación intracelular del parásito. La iNOS utiliza el aminoácido L-Arginina para producir ON mientras que la IDO utiliza el aminoácido esencial triptofano para producir kinureninas, ambos metabolitos tóxicos para el parásito.^{18-20,22,23} La activación de la enzima iNOS y la concomitante producción de ON, junto con el incremento en la actividad de IDO están relacionadas con un perfil de activación de macrófagos de tipo clásico pro-inflamatorio (M1). Por otra parte, al igual que iNOS, la enzima Arginasa-1 emplea L-Arginina como sustrato. La activación de Arginasa-1 lleva a la producción de poliaminas (prolina, putrescina y espermina), que promueven la sobrevivencia de *T. cruzi* en el interior de los macrófagos.^{45,46} La activación de la enzima Arginasa-1 se relaciona con un perfil de activación alternativo M2. *T. cruzi* es capaz de modificar el balance metabólico iNOS/Arginasa-1, y de limitar la producción de ON en macrófagos infectados como mecanismo de evasión de la respuesta inmune protectora.⁴⁷

Debido a que la actividad inflamatoria a corto plazo es beneficiosa para combatir la infección, pero la persistencia crónica de procesos inflamatorios pueden provocar daños en los tejidos del hospedador, una mejor comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que orquestan las diferentes señales que promueven una eficiente activación de macrófagos capaces de restringir la replicación de parásitos, seguida de una oportuna regulación para prevenir el desarrollo de inmunopatología es importante para diseñar mejores estrategias terapéuticas.

Las vías de señalización Wnt

Las vías de señalización dependientes de proteínas Wnt, muy conservadas evolutivamente, desempeñan roles clave en procesos de regulación, diferenciación, proliferación, motilidad, polarización y muerte celular.⁴⁸⁻⁵⁰

Las proteínas Wnt son glicoproteínas que pueden ser sintetizadas por diversos tipos celulares de organismos multicelulares. En la actualidad se han identificado tanto en humanos como en ratón 19 genes que codifican cada uno para una proteína Wnt diferente (Tabla 1). Luego de su traducción y antes de dejar el retículo endoplásmico, las proteínas Wnt sufren modificaciones post-transcripcionales dentro de las cuales la glicosilación y la acilación son las más importantes. La acilación es llevada a cabo principalmente por la enzima O-aciltransferasa “*Porcupin*” (PORC) que cataliza la transferencia de un ácido graso mono-insaturado (ácido palmítico) a una serina. Esta modificación lipídica es necesaria tanto para la secreción como para la señalización dependiente de proteínas Wnt. Posteriormente, la proteína Wntless transporta las proteínas Wnt desde el retículo endoplásmico hacia la membrana plasmática para finalizar su secreción hacia el exterior celular (Fig. 6).^{49,51}

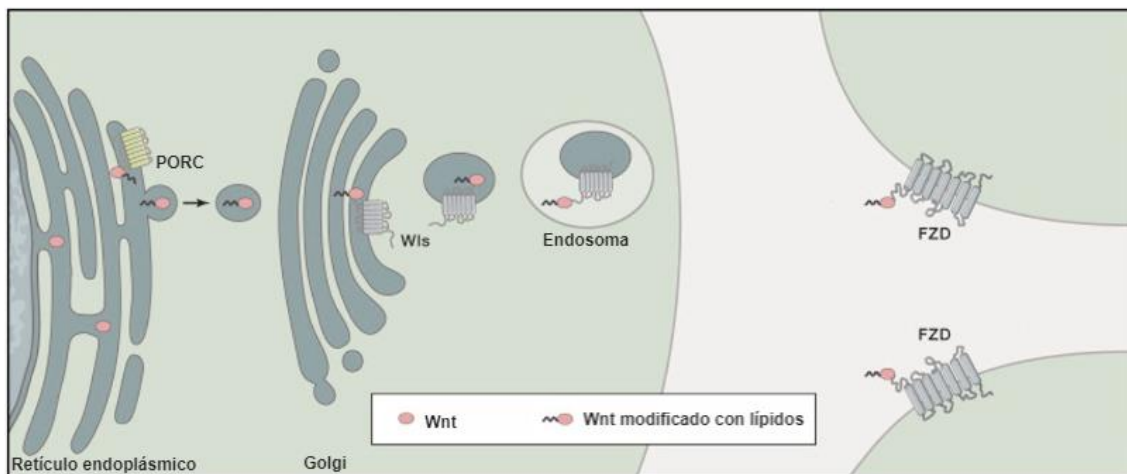


Figura 6 | Modelo de secreción de proteínas Wnt.

En el retículo endoplásmico, la O-acil-transferasa PORC modifica a las proteínas Wnt agregándole un residuo lipídico necesario para su secreción y señalización. El transporte de la proteína Wnt modificada es regulado por la proteína Wntless (Wls), posiblemente involucrando endosomas. Las proteínas Wnt son secretadas en vesículas exocíticas. Fuera de la célula productora, pueden unirse a receptores Frizzled (Fzd) de la misma célula o células vecinas para señalizar de forma autócrina o parácrina.

ADAPTADO DE: Nusse, R. (2017). *Wnt/β-catenin Signaling, Disease and Emerging Therapeutic Modalities*. [Figura 1]. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>

	Fenotipo en ratones KO y funciones	Humanos
Wnt1	Pérdida de masa en cerebro y cerebelo. Deficiencia en derivados de la cresta neural, precursores dorso-laterales neurales y en el tubo neural. Disminución en el número de timocitos.	Osteogénesis imperfecta.
Wnt2	Defectos en la placenta. Desarrollo pulmonar defectuoso.	
Wnt2b/13	Diferenciación de células de la retina. Desarrollo pulmonar defectuoso. Reducción del bulbo olfatorio.	
Wnt3	Defectos en la gastrulación temprana. Crecimiento de pelo. Defectos en el establecimiento de la cresta ectodérmica apical. Neurogénesis del hipocampo.	Síndrome de tetra-amelia
Wnt3a	Deficiencia en derivados de la cresta neural, precursores dorso-laterales neurales y en el tubo neural. Pérdida del hipocampo. Asimetría izquierda-derecha. Defectos en la renovación de células madre.	
Wnt4	Defectos renales. Determinación del sexo. Ramificación lateral de glándulas mamarias. Disminución en el número de timocitos. Represión de la migración de precursores esteroideos suprarrenales hacia las gónadas. Desarrollo pulmonar.	Síndrome Serkal. Regresión del conducto de Muller.
Wnt5a	Morfogénesis pulmonar distal. Diferenciación de condrocitos, crecimiento longitudinal esquelético. Inhibición de la proliferación y funciones supresoras de tumor de células B. Defectos en el crecimiento del tracto reproductivo femenino. Fenotipo de la glándula mamaria y desarrollo de la próstata. Elongación intestinal. Diferenciación de células endoteliales	Síndrome Robinow.
Wnt5b		Susceptibilidad a diabetes tipo II.
Wnt6	Proliferación de células estromales del embrión.	
Wnt7a	Polaridad del limbo. Infertilidad en hembras. Desarrollo uterino. Disminución de sinapsis en cerebelo. Promoción del desarrollo neuronal.	Síndrome de Fuhrmann.
Wnt7b	Defectos en el desarrollo de la placenta. Falla respiratoria. Hipoplasia pulmonar. Desarrollo pulmonar. Inducción de apoptosis en macrófagos. Desarrollo del eje córtico-medular renal.	
Wnt8a		
Wnt8b	Cambios en la expresión génica durante el desarrollo neuronal.	
Wnt9a	Integridad auricular.	
Wnt9b	Regulación de la transición mesenquimal-epitelial. Inducción de vesículas renales.	
Wnt10a	Polaridad celular planar en el epitelio renal. Anormalidades esqueléticas y dentales.	Displasia dermal odontológica.
Wnt10b	Pérdida de masa ósea. Pérdida de genes que promueven la co-expresión de programas miogénicos y adipogénicos. Su sobreexpresión inhibe la adipogénesis.	Mutaciones en pacientes diabéticos. Malformación en manos y pies.
Wnt11	Defectos en el uréter. Cardiogénesis.	
Wnt16	Fenotipo de densidad ósea.	Densidad ósea.

Tabla 1 | Proteínas Wnt presentes en vertebrados.

Se han identificado 19 proteínas Wnt en vertebrados. Hasta el momento sus funciones han sido estudiadas en modelos de ratones deficientes (KO) y algunas alteraciones en su expresión han sido relacionadas con enfermedades humanas. Adaptado de la revisión de Roel Nusse en “The Wnt Home Page” (página oficial): <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>

Las proteínas Wnt actúan como ligandos que se unen principalmente a receptores Frizzled (Fzd) y en algunos casos a co-receptores para activar diferentes cascadas de señalización celular de forma autórina o parácrina. Los receptores Fzd son miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G con siete dominios hidrofóbicos transmembrana. El dominio amino terminal extracelular rico en cisteínas (CRD) determina su estructura tridimensional y es necesario para la unión de las proteínas Wnt. Estos receptores se expresan exclusivamente en la superficie de células respondedoras a proteínas Wnt, y pueden ser internalizados como parte de un mecanismo regulatorio.^{48,52}

El genoma de los mamíferos codifica 19 proteínas Wnt y 10 receptores Fzd, lo cual sugiere que existen 190 potenciales combinaciones Wnt / Fzd, y se ha propuesto que las proteínas Wnt activan diferentes vías de señalización, que a su vez pueden interaccionar con numerosas otras vías y requerir co-receptores. De esta manera, dependiendo cuál sea la combinación Wnt / Fzd, los co-receptores presentes, el tipo y el contexto celular, se produce la formación de un complejo que desencadena diferentes señales de transducción celular.⁴⁹ Recientemente se ha demostrado que esta familia de proteínas y sus receptores no solo se expresan en células inmunes en desarrollo, sino que también en células del sistema inmune innato y adaptativo diferenciadas. Las vías de señalización dependientes de la unión Wnt-Fzd más importantes en células inmunes son:

- Vía de señalización Wnt / Ca⁺⁺
- Vía de señalización Wnt / β -catenina (vía canónica).

Vía de señalización Wnt / Ca⁺⁺

El calcio es un mensajero intracelular muy versátil utilizado por casi todas las células y es partícipe de numerosos procesos dentro de los cuales se incluyen la contracción muscular, la activación de enzimas y la transcripción de genes. Las células poseen múltiples vías de señalización que pueden activarse en respuesta a diversos estímulos y generar una amplia gama de señales que inducen cambios en los niveles citoplasmáticos de calcio. En condiciones fisiológicas, el calcio se encuentra en el citoplasma celular en niveles muy bajos pero puede elevarse rápidamente en respuesta a múltiples mecanismos tales como: cambios de voltaje, apertura de canales de Ca⁺⁺ que censan metabolitos extracelulares como glutamato y ATP, apertura de canales de Ca⁺⁺ que censan moléculas intracelulares como cAMP, cGMP, 1,2-diacilglicerol (DAG) y ácido araquidónico; y

liberación de Ca^{++} almacenado en organelas celulares, principalmente retículo endoplásmico, en respuesta a moléculas como inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3).⁵³

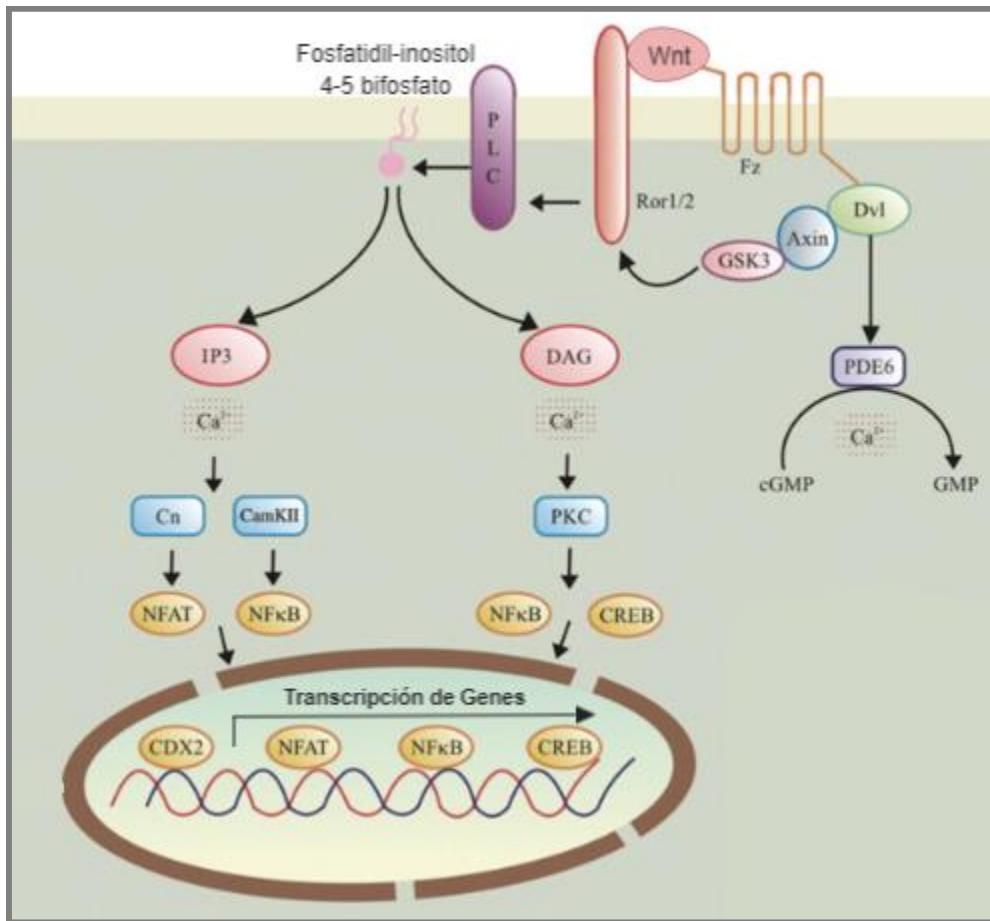


Figura 7 | Representación esquemática de la vía de señalización Wnt / Ca^{++} .

Las proteínas Wnt unidas a receptores Fzd interaccionan con el co-receptor Ror1/2 induciendo la producción de inositol-trifosfato (IP_3) y diacil-glicerol (DAG) a partir del fosfatidil-inositol 4-5 bifosfato de la membrana celular por acción de la proteína fosfolipasa-C (PLC). Se conforma un complejo compuesto por Dvl/Axina/GSK-3 β y GSK-3 β media la fosforilación del co-receptor Ror1/2. IP_3 induce la liberación de iones Calcio (Ca^{++}) desde el retículo endoplásmico; calcineurina (Cn) y la quinasa respondedora a calmodulina (CAMKII) se activan y producen la activación de NFAT y NF- κ B. El DAG es activado por la liberación de Ca^{++} desde el retículo endoplásmico y activa a la proteína quinasa C (PKC). PKC activa a NF- κ B y CREB. Los factores de transcripción NFAT, NF- κ B y CREB translocan al núcleo e inducen la transcripción de genes blanco.

ADAPTADO DE: De, A. (2011). *Wnt/Calcio Signaling Pathway: a brief overview*. [Figura 1]. DOI:10.1093/abbs/gmr079.

No está claro cómo las proteínas Wnt pueden aumentar la concentración de calcio intracelular. Se ha descrito que la interacción Wnt / Fzd en presencia del co-receptor Ror 1/2 activa a la proteína fosfolipasa C (PLC) que conduce a la producción de IP_3 y DAG a partir de la hidrólisis del fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato unido a la membrana plasmática (Fig. 7). El IP_3 generado difunde a través del citosol e interacciona con los

canales de calcio presentes en la membrana del retículo endoplásmico ocasionando liberación de Ca^{++} desde el retículo hacia el citoplasma celular. Una vez que aumenta su concentración en el citoplasma, los iones de calcio activan la proteína Calcineurina (Cn) que se encuentra ampliamente distribuida en el citosol y promueve la desfosforilación del factor nuclear asociado a células T (NFAT) induciendo su activación. De manera similar, los iones de calcio en conjunto con la proteína Calmodulina activan la proteína quinasa dependiente de Calmodulina (CAMKII) (Fig. 7). Por su parte el DAG junto con el Ca^{++} liberado del retículo endoplásmico activan la proteína quinasa C (PKC). Tanto CAMKII como PKC activan NF- κ B. PKC además es capaz de activar la proteína CREB (del inglés cAMP response element-binding). Luego de su activación, NF- κ B, NFAT y CREB translocan al núcleo en donde inducen la transcripción de diferentes genes implicados en una amplia variedad de funciones biológicas y en la modulación de la inflamación⁴⁸ (Fig. 7). Además, la interacción Wnt / Fzd puede activar la fosfo-diesterasa-6 (PDE6) en presencia de altas concentraciones de Ca^{++} citoplasmático, generando una disminución en los niveles de GMPc.⁵³

Vía de señalización Wnt / β -catenina (canónica)

β -catenina es la proteína clave en la vía Wnt / β -catenina o canónica. Su estabilidad está controlada por el “complejo destructor” conformado por Axina, la proteína supresora de tumores adenomatosa poliposis coli (APC), caseína-quinasa (CK1) y el glucógeno sintetasa quinasa 3 β (GSK-3 β). En este complejo Axina actúa como proteína aglutinante entre β -catenina, APC, CK1 y GSK-3 β (Fig. 8).^{51,52} APC contiene tres motivos de unión a Axina que a su vez se une a β -catenina. En ausencia de ligandos Wnt, CK1 y GSK-3 β secuencialmente fosforilan la β -catenina unida a Axina en los residuos de Serinas (Ser) / Treoninas (Thr) terminales. La primera fosforilación de β -catenina es llevada a cabo por CK1 en Ser-45 y es seguida de las fosforilaciones llevadas a cabo por GSK-3 β en los residuos Thr-41, Ser-37 y Ser-33 (Fig. 9).⁵⁴ Estos motivos fosforilados actúan como sitio de acoplamiento para la ubiquitina ligasa E3 que induce la ubiquitinación de β -catenina para promover su posterior degradación en el proteasoma (Fig. 8).⁵¹

Cuando una proteína Wnt se une a un receptor Fzd, los receptores Fzd dimerizan con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP5/6) conduciendo cambios conformacionales en ambos receptores. Como consecuencia, la cola citoplasmática del receptor LRP5/6 es fosforilada por GSK-3 β , y recluta a la proteína aglutinante Axina (Fig. 8). Por su parte, el extremo citoplasmático de receptores Fzd puede unir a la proteína

Dishevelled (DVL) que, a través de su dominio DIX facilita la interacción entre LRP y Axina. La conformación del multímero Wnt / Fzd / DVL / LRP / Axina, promueve la translocación del complejo destructor de β -catenina hacia la membrana citoplasmática e interfiere con su actividad (Fig.8).⁵⁰ Al mismo tiempo, el receptor LRP fosforilado inhibe a GSK-3 β de forma directa. Como consecuencia, β -catenina queda libre y se acumula en el citoplasma, lo cual se conoce como “estabilización de β -catenina”.^{50,51}

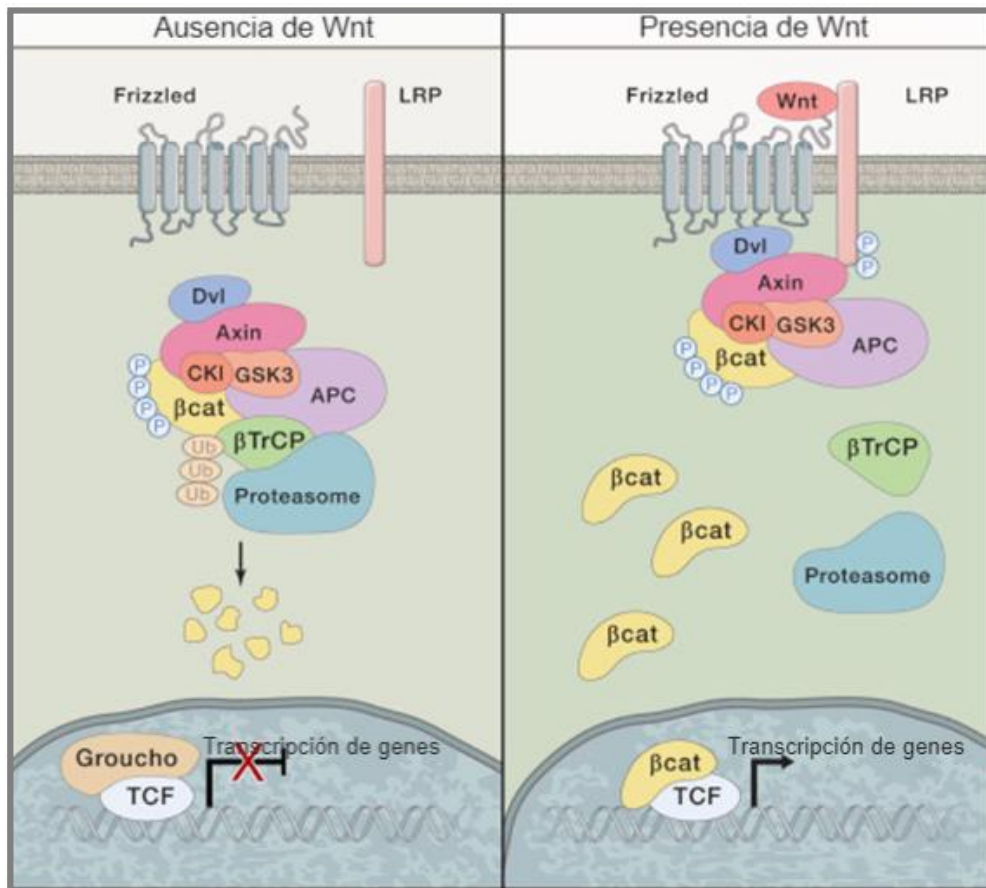


Figura 8 | Representación esquemática de la vía de señalización Wnt / β -catenina.

En ausencia de señalización Wnt, β -catenina es retenida en el citoplasma celular por un complejo de proteínas que incluye a Axina (Axin), Adenomatosa poliposis coli (APC), Caseína quinasa-1 (CK1) y glucógeno-sintetasa-quinasa 3 β (GSK-3 β). CK1 y GSK-3 β fosforilan a β -catenina en Ser45, Ser33, Ser37 y Thr41 transformándola en blanco de la ubiquitina-ligasa β TrCP que induce su degradación en el proteasoma. En presencia de señalización Wnt / Fzd y el co-receptor LRP5/6, la proteína Dishevelled (Dvl) participa en la separación del complejo destructor, dando lugar a la estabilización de β -catenina que se acumula en citoplasma y luego transloca al núcleo celular. En el núcleo, TCF se encuentra en estado inactivo como consecuencia de la unión al represor Groucho. β -catenina desplaza a Groucho, y actúa como co-activador de TCF y LEF induciendo la transcripción de sus genes blanco.

ADAPTADO DE: Nusse, R. (2017). *Wnt/ β -catenin Signaling, Disease and Emerging Therapeutic Modalities*. [Figura 4]. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>

Como mecanismo alternativo, se ha propuesto que luego de la conformación del multímero, dominios regulatorios altamente conservados presentes en APC pueden inhibir la señalización de β -catenina promoviendo su ubiquitinación. Un estudio más reciente, propone que la quinasa GSK-3 β fosforila la región CID induciendo un cambio conformacional en la proteína APC que permite el acceso de la ubiquitina ligasa E3 a β -catenina.⁵¹

Luego de su estabilización, β -catenina transloca hacia el núcleo en donde forma un complejo transcripcional con miembros de la familia de factores de transcripción TCF y LEF que se unen a secuencias específicas del ADN. En ausencia de β -catenina, TCF se encuentra unido al represor transcripcional Groucho el cual silencia la expresión de genes mediada por TCF. β -catenina posee la capacidad de desplazar a Groucho, siendo este el primer paso para la formación del complejo de transcripción (Fig. 8). El complejo β -catenina/LEF-1 activa la transcripción de genes, mientras el de β -catenina/LEF-3 actúa como represor. La unión TCF/LEF-1 involucra la región central de β -catenina. Moléculas como CBP, p300, BCL9, Tip60, entre otras; actúan como co-activadores del complejo transcripcional. Finalmente, la formación del complejo de transcripción β -catenina/TCF/LEF, promueve la transcripción de un gran número de genes blanco de esta vía de señalización. Mientras la mayoría de los genes blanco de Wnt son específicos de linaje y del estadio del ciclo celular en las determinadas poblaciones, el gen *Axin* es un gen blanco que usualmente se utiliza como indicador de la actividad de la vía Wnt canónica.^{48,51}

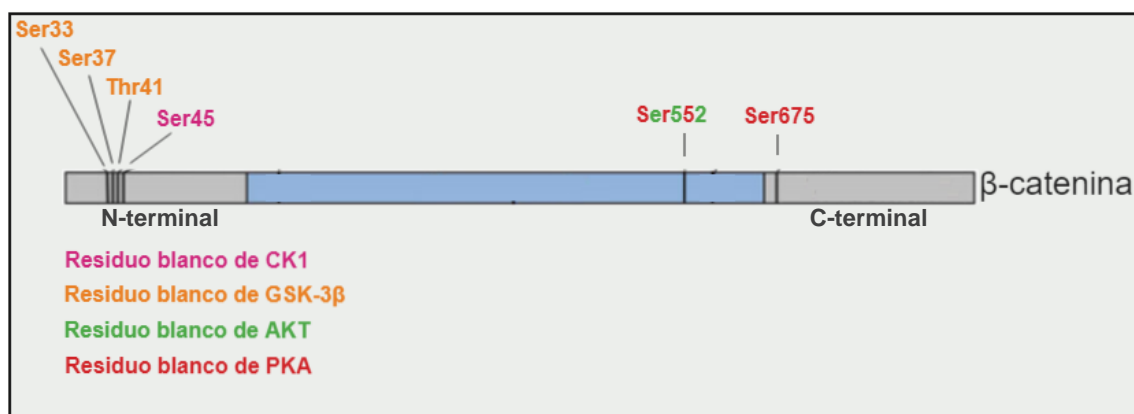


Figura 9 | Sitios de fosforilación de β -catenina.

β -catenina es fosforilada en su extremo N-terminal por CK1 (rosado) y luego por GSK-3 β (naranja). Estas fosforilaciones vuelven a β -catenina blanco de β TrCP que induce su degradación en el proteasoma. Además, β -catenina puede ser fosforilada por AKT (verde) y PKA (rojo). Estas fosforilaciones promueven su estabilización y translocación hacia el núcleo.

ADAPTADO DE: Verheyen, E. (2009). *Regulation of Wnt/ β -catenin Signaling by protein kinases*. [Figura 2]. DOI: 10.1002/dvdy.22019.

Cabe destacar que la interacción de β -catenina con los factores de transcripción TCF/LEF puede ocurrir, en determinados contextos, de manera independiente de Wnt. En este sentido, las proteínas quinasas AKT y PKA son capaces de fosforilar a β -catenina en Ser-552 (p-Ser552- β -catenina), mientras que además PKA puede fosforilarla en Ser-675 (p-Ser675- β -catenina) (Fig. 9).^{50,55,56} El resultado de estas fosforilaciones, es la translocación de β -catenina hacia el núcleo celular. La cascada de señalización dependiente de AKT puede activarse de diversas formas entre las que se incluye la señalización por receptores de tirosinas-quinasas, integrinas, receptores de células B y T, receptores de citoquinas, receptores acoplados a proteínas G y otros estímulos que inducen la producción de fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) por parte de la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K). Por su parte, la unión de cAMP a la Serina/Treonina-quinasa PKA activa las subunidades catalíticas de esta quinasa, lo cual induce la fosforilación de proteínas blanco y la regulación de numerosos procesos fisiológicos. En general, durante reacciones inflamatorias la activación de la vía Wnt/ β -catenina en Mo y CD lleva al desarrollo de respuestas supresoras potencialmente capaces de prevenir la excesiva inflamación y contribuir a la homeostasis.

Diálogo entre la señalización dependiente de TLR y β -catenina

Ha sido reportado que la señalización mediada por STAT3, TLR2, TLR4 y NF- κ B inducen la expresión de proteínas Wnt y receptores Fzd y, por otro lado, la señalización por TLRs activa β -catenina de manera independiente de proteínas Wnt.^{21, 26, 28, 30-37} Además, algunos ligandos de TLR2 (*Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium avium*) o de TLR4 (LPS) son capaces de inducir, a través de la activación de NF- κ B y la secreción de citoquinas proinflamatorias (TNF), la expresión de algunas proteínas Wnt y receptores Fzd.^{57,58} Por otro lado, se ha demostrado que la transcripción del gen que codifica para Wnt5a es regulado por el factor de transcripción STAT3 que participa de la cascada de señalización iniciada por las citoquinas IL-6, IL-11 e IL-27 y por otras cascadas de señalización en las que participan NF- κ B, Hedgehog, TGF- β y Notch.⁵⁹ Así mismo IL-4 también es capaz de incrementar los niveles de β -catenina en macrófagos.⁶⁰ Estos resultados demuestran la factibilidad de la activación de la vía Wnt / β -catenina en contextos inflamatorios.

Como se mencionó anteriormente la señalización a través de TLR es capaz de activar en forma Wnt independiente a β -catenina y en esta activación participan las quinasas AKT y PKA.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ La señalización PI3K–AKT es rápidamente inducida en respuesta a la activación de TLR para promover una respuesta coordinada y efectiva contra de la invasión de patógenos.⁶¹ La unión de LPS a TLR4 activa PI3K que fosforila AKT en Treonina (Thr)-308 y Ser-473.^{61–65} Además, PI3K y AKT activadas fosforilan a GSK-3 β en Ser-9, una modificación que inactiva a esta enzima y como consecuencia se activa β -catenina para regular la respuesta.^{62,64} Así, la activación del eje TLR / PI3K / AKT actúa como un regulador negativo y como un mecanismo compensatorio que controla la inflamación y limita la apoptosis en respuesta a estímulos inflamatorios sostenidos.⁶⁶ Recientemente se ha demostrado que el parásito *Leishmania donovani* mediante la activación de AKT que induce p-Ser552- β -catenina inhibe la apoptosis y la respuesta pro-inflamatoria de macrófagos infectados para promover su sobrevivencia en el citoplasma celular.⁵⁶ De la misma manera, cuando *Porphyromonas gingivalis* es reconocida por TLR2, activa PKA que inactiva a GSK-3 β inhibiendo la muerte dependiente de iNOS en macrófagos infectados.^{67,68}

Se ha reportado que al igual de *L. donovani*, *T. cruzi* activa AKT y PKA en las células que como estrategia anti-apoptótica para sostener su sobrevivencia⁶⁹, sin embargo, los mediadores que promueven la sobrevivencia de *T. cruzi* luego de la activación de AKT aún no han sido totalmente dilucidados.⁷⁰

Rol de las vías de señalización Wnt en células del sistema inmune

Aún no han sido completamente esclarecidos los mecanismos y las funciones de las vías de señalización Wnt en el desarrollo de las células del sistema inmune. Sin embargo, en los últimos años los reportes sobre el rol de las proteínas Wnt y la consecuencia de la señalización Wnt en diferentes células del sistema inmune han sugerido que poseen una función importante en la regulación de la respuesta inmune.⁷¹

Las vías Wnt son reguladoras esenciales de la homeostasis de tejidos. Además, desbalances en la actividad de Wnt se ha asociado con muchas enfermedades humanas, como el cáncer, los trastornos degenerativos y trastornos inflamatorios. Debido a que el tipo de señalización Wnt que se activa es dependiente de la identidad de la proteína Wnt, los receptores Fzd presentes como así también del contexto celular, los aportes en el

esclarecimiento de la participación de estas vías en células del sistema inmune podrían ser importantes para la identificación de nuevos blancos terapéuticos.⁵¹

Señalización Wnt en células dendríticas

Las CD_s son un importante subgrupo de células del sistema inmune que inician e instruyen la respuesta inmune adaptativa. Las vías Wnt participan en la diferenciación de CD_s tanto en humanos como en ratón⁷² y diferentes estudios han demostrado que la activación de las vías Wnt canónica y no-canónica en CD_s está asociadas al desarrollo de un perfil tolerogénico, la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, la inducción de células Treg y la inhibición de la respuesta inmune adaptativa.⁴⁻¹⁰

β -catenina puede activarse en CD_s por la señalización a través de diferentes PPR como TLRs, Fc γ o dectina-1 y la liberación de β -catenina del complejo con E-caderina llevando a la transcripción de genes regulados por el complejo β -catenina TCF/LEF como las citoquinas anti-inflamatorias IL-10, IL-27 y TGF- β que promueven el desarrollo de células CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IL-10 y células Treg respectivamente. Además, la señalización dependiente de β -catenina en CD_s induce la expresión de la enzima que metabolizan vitamina A (RALDH) que convierte la vitamina A en ácido retinoico (RA) que induce la diferenciación a Treg. La acumulación de diferentes tipos de células regulatorias resulta en la inhibición de la respuesta de células Th1, Th17 o células citotóxicas CD8⁺.⁷³ Así, se ha demostrado que ratones deficientes en β -catenina en CD_s son más susceptibles que los ratones salvajes (WT) a la colitis inducida por dextran sulfato (DSS), un modelo experimental para el estudio de la enfermedad inflamatoria intestinal. Esta deficiencia promueve una respuesta inflamatoria de tipo Th1/Th17 y falta de control por las células Treg indicando un importante rol de esta proteína en CD_s para el mantenimiento de la tolerancia en las mucosas.⁷²

Las proteínas Wnt3a y Wnt5a contribuyen en la inducción de CD_s murinas tolerogénicas ya que pueden reprogramar CD_s estimuladas con LPS.⁷⁴ Asimismo, recientemente se ha demostrado que el melanoma secreta Wnt5a y Wnt3a que, a través de la vía de Ca⁺⁺ y β -catenina respectivamente, inducen CD_s tolerogénicas para establecer un sitio de inmunoprivilegio.⁷⁵ El melanoma establece un sitio inmuno-privilegiado secretando Wnt5a y Wnt3a que señalizan, y reprograman a las CD_s para inducir tolerancia.⁷⁴

La deficiencia de co-receptores LRP5/6 en CD8⁺ inhibe la producción de IL-10 y TGF- β a la vez que incrementa la producción de IL-12, TNF e IL-6 y exacerba la inflamación promoviendo un perfil de respuesta Th1/Th17 en el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental.⁷³ De manera similar, la deficiencia puntual de LRP5/6 en CD8⁺ incrementa la inmunidad anti-tumoral por suprimir la expansión de células Treg e incrementar la función efectora de células CD8⁺ productoras de TNF, IFN- γ y granzimas.⁷⁶

Señalización Wnt en macrófagos

La señalización Wnt cumple funciones heterogéneas en Mo, las cuales parecen depender de la fase en que se encuentra la respuesta inflamatoria.

Bajo condiciones homeostáticas Wnt5a es necesaria para prolongar la supervivencia y mantener la capacidad microbicida de macrófagos.¹¹ Sin embargo, en condiciones inflamatorias la activación de la vía Wnt/Ca⁺⁺ está asociada a inflamación y participa amplificando el estado inflamatorio. Así, Wnt5a inducida por señalización a través de TLR es típica de estados inflamatorios y sepsis. En la infección con *M. tuberculosis* Wnt5a secretada por macrófagos infectados se une a Fzd5 e induce por la vía no canónica Wnt/Ca⁺⁺ la secreción de citoquinas inflamatorias (IL-12, IL-6 y TNF) y consecuentemente la inducción de respuesta adaptativa de tipo Th1.¹¹⁻¹³ Luego de la infección de Mo murinos con *Escherichia coli* o *Chandipura virus*, la señalización Wnt5a/Fzd5 induce la producción de IFN- γ y promueve la supervivencia celular.⁷⁷ Sin embargo, en otros casos de inflamación aguda, Wnt5a participa en la inducción de mecanismos anti-inflamatorios capaces de controlar una respuesta inmune excesiva.^{11,14-16} Un ejemplo de control de la inflamación por activación de la vía canónica, es la producción de Wnt3a por células epiteliales bronquiales durante la infección con *M. tuberculosis*, que a través de su unión al Fzd1 expresado en Mo, controla la respuesta inflamatoria.^{13,17}

La expresión de Wnt5a en tumor mamario humano está asociada con la presencia de macrófagos asociados a tumor (TAMs) con potentes propiedades pro-tumorales.⁷⁸ Además, se ha demostrado que la expresión incrementada de Wnt7b en tumores mamaros humanos, está asociada con la presencia TAMs, angiogénesis y metástasis pulmonar.⁷⁹

Los macrófagos cumplen importantes roles en los procesos de reparación tisular y fibrosis luego de que se produce algún tipo de injuria, y la expresión de ligandos Wnt en estas células es crítica en la regulación de estos procesos.⁸⁰ Se ha reportado que los macrófagos alveolares residentes en tejidos y reclutados tienen activada la vía Wnt/ β -catenina durante el proceso de fibrosis pulmonar inducida por drogas. Cuando se inhibe la señalización Wnt/ β -catenina, en modelos experimentales en ratones deficientes en LRP5 o en β -catenina, la fibrosis inducida por drogas es similar, pero la resolución se acelera en comparación con la observada en ratones WT, indicando que los macrófagos se comportan como antifibróticos y promueven la resolución de la lesión cuando pierden la señalización Wnt/ β -catenina.^{81,82} También en corazón la reparación luego del infarto agudo de miocardio es mediada en parte por macrófagos.⁸³ Estudios recientes demostraron que ratones deficientes en la proteína Wntless, necesaria para la secreción de proteínas Wnt, en macrófagos, presentan mejor reparación y funcionalidad cardíaca que los ratones WT luego de la isquemia en un modelo de infarto inducido por drogas.⁸³ Lo contrario ocurre en intestino, donde en un modelo de delección de la proteína PORC, también necesaria para la secreción de proteínas Wnt, se demostró que las proteínas Wnt secretadas por macrófagos son necesarias para la reparación tisular luego de la injuria inducida por radiación.⁸⁴ En consistencia, en otro modelo de colitis, la deficiencia de Wnt2b, Wnt7b y Wnt10 se asocia con menor reparación del tejido.⁸⁵ En riñón la delección de Wnt7b en macrófagos impide la reparación normal y la regeneración del tejido luego de la reperfusión post-isquemia.⁸⁶ Además, se ha demostrado que durante la regeneración de las vías biliares en ratones adultos con enfermedad hepática crónica, las proteínas Wnt involucradas son secretadas por los macrófagos hepáticos.⁸⁷

En resumen, estos estudios indican que en macrófagos las proteínas Wnt y los efectores moleculares de estas vías de señalización cumplen un rol importante en la injuria y reparación de tejidos y la regulación de procesos infecciosos.

Señalización Wnt en células T CD4+

Las células T CD4+ se diferencian en 5 subtipos de células T colaboradoras (Th del inglés T helper): Th1, Th2, Th17, Thf y Treg. Las células Th1, Th2 y Th17 secretan diferentes perfiles de citoquinas ante diferentes contextos inflamatorios e infecciosos, las Thf son

importantes en el mantenimiento de la respuesta inmune humoral y las células Treg son importantes en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica.^{88, 89}

En el modelo murino de infección crónica por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) se ha demostrado que la diferenciación de células T CD4⁺ de memoria es dependiente de la expresión del factor de transcripción TCF-1.⁹⁰ Además, TCF-1 participa en la inducción de la expresión del factor de transcripción GATA3, característico de las células Th2.⁹¹ En concordancia, se ha demostrado que Wnt3a promueve la diferenciación de células T CD4⁺ de cordón umbilical humano hacia el perfil Th2 mediante un mecanismo dependiente de β -catenina⁹² y que Wnt10b participa regulando la inflamación mediada por células Th2 en un modelo murino de asma.⁹³

Los factores de transcripción TCF-1 y LEF-1 inducen la expresión de IL-6R α y gp130 que promueven la expresión del factor de transcripción Bcl-6, característico de las células Thf⁹⁴ y aunque si bien no hay evidencia experimental suficiente para implicar a la vía Wnt/ β -catenina en este proceso, los resultados sugieren que la señalización Wnt participa de la diferenciación de células Thf a nivel transcripcional.^{94,95}

Por otro lado, la deficiencia de TCF-1 se asocia a un incremento en las células T CD4⁺ productoras de IL-17 (Th17) y exacerbación del daño clínico en el modelo murino de encefalitis autoinmune experimental (EAE). En este modelo, se ha reportado que TCF-1 es un activador transcripcional del gen de IL-17.⁹⁶

También se ha reportado la participación de las vías de señalización Wnt en la migración de las células T.⁹⁷⁻¹⁰¹ Wnt5a es necesaria para sostener la expresión del receptor CXCR4 y permitir la migración de las células T inducida por la quimiocina CXCL12.⁹⁹ Además, se ha demostrado que β -catenina y GSK-3 β pueden mediar la migración de células T de manera independiente de la señalización Wnt.^{100,101}

Las células Treg son un importante subgrupo de células CD4⁺ que pueden ser generadas tanto en la periferia (pTreg) como en timo (tTreg).⁸⁹ Diferentes estudios en los cuales se estabiliza la señalización Wnt/ β catenina han demostrado que la activación de esta vía en células T induce inmunosupresión tanto por efecto directo sobre las células T efectoras como por la estabilización de células Treg.^{102,103} En el mismo sentido, la delección específica de la proteína APC, reguladora negativa de la vía Wnt canónica, en células Treg resulta en un fenotipo autoinmune de esplenomegalia, disminución de las funciones supresoras de las Treg y progresión del desarrollo tumoral en ratones.¹⁰⁴ Otros estudios

también han reportado que las células Treg deficientes en APC exhiben una diferenciación reducida y menor capacidad de producir IL-10 que es esencial para suprimir la inflamación intestinal en modelos murinos de cáncer de colon.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶

En contraposición, otros grupos han demostrado que la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina con proteínas Wnt, como Wnt3a, tanto *in vivo* como *in vitro*, inhibe la capacidad supresora de las células Treg e induce propiedades pro-inflamatorias en las células T efectoras.^{18,19} Así, estos autores proponen un modelo en el cual las proteínas Wnt secretadas en condiciones inflamatorias reprimen la función de las células Treg permitiendo el desarrollo de una respuesta inmune protectora.¹⁸

En conjunto, lo expuesto revela que el rol de TCF-1 y β -catenina en la diferenciación de células T CD4+ y en la diferenciación y funcionalidad de células Treg es controvertido, mientras que la participación de esta vía en el desarrollo de memoria inmunológica ha sido más estudiada en células T CD8+.

Señalización Wnt en células T CD8+

La diferenciación y persistencia de células T CD8+ de memoria son reguladas por los factores de transcripción TCF-1/LEF-1 de manera dependiente de las vías Wnt.^{107,108} Estos factores cumplen un rol esencial en la maduración, longevidad y expansión secundaria de las células T CD8+ de memoria.^{107,107,109} El factor de transcripción TCF-1 está implicado principalmente en la diferenciación a células efectoras y de memoria y en la supresión de genes asociados a la función citotóxica de células CD8+.⁷¹ Así, se ha demostrado que la estabilización de β -catenina y su interacción con TCF-1 en células T CD8+ murinas promueve el desarrollo de un fenotipo CD8 de memoria *vs* efector.^{110,111} De esta manera el nivel de expresión de TCF-1 en las células CD8+ regularía el balance entre el desarrollo de células efectoras y de memoria.

En contraposición, recientemente se ha demostrado que la activación de la vía canónica inhibe la diferenciación inducida por IL-12 de células T CD8+ a células de memoria.²⁰

Participación de las vías Wnt en patologías

Como ya se ha comentado, el desarrollo de la respuesta inflamatoria aguda es necesaria para iniciar una respuesta inmune eficiente frente a procesos infecciosos, sin embargo, cuando la inflamación no se controla, se mantiene en forma crónica y excesiva puede desencadenar reacciones alérgicas y autoinmunidad. Las vías Wnt actúan como interruptores moleculares en células las CPAs ya que pueden programar a estas células para promover respuestas robustas de células T y contener la respuesta inflamatoria excesiva, confiriendo de este modo protección frente a la inmunopatología. Sin embargo, el control temprano de la inflamación puede impedir el desarrollo de la respuesta necesaria para controlar procesos infecciosos e incluso la inmunidad anti-tumoral.

La importancia de la señalización Wnt en enfermedades inflamatorias es consistente con el rol que cumplen las proteínas Wnt durante la injuria y reparación tisular.^{112,113} La activación aberrante de las vías Wnt es común a diferentes tipos de tumores, principalmente estudiada en cáncer de colon y melanoma donde se ha reportado estabilización de APC y β -catenina, también ha sido reportado en cáncer de mama (incremento de Wnt-1, mutaciones en TCF-1), carcinoma hepatocelular (mutaciones en el gen de Axina 1) y adenomas intestinales (mutaciones en TCF-1), entre otros.^{11,122,123}

Recientemente se han descrito numerosas enfermedades genéticas degenerativas causadas por mutaciones en componentes de la señalización Wnt que afectan a diversos tipos celulares.⁵¹ Debido a que tanto la vía Wnt-canónica como las no-canónicas tienen un rol crítico durante el desarrollo cardiovascular, no es sorprendente que las proteínas Wnt estén intrínsecamente involucradas en el desarrollo de enfermedades vasculares y cardíacas. Así, se ha demostrado la participación de las proteínas Wnt en la patogénesis de aterosclerosis, angiogénesis de la retina e hipertensión arterial pulmonar.¹¹⁴ Además, se ha demostrado la participación de las vías Wnt en la regeneración cardiovascular luego del infarto agudo de miocardio, arritmias, hipertrofia y falla cardíaca debido al importante rol de las vías Wnt en la diferenciación de células madre o progenitoras a cardiomiocitos.¹²⁴

Por otra parte, ciertas infecciones y el microambiente inflamatorio que se desarrolla componentes de las vías de señalización Wnt que pueden modular el fenotipo de respuesta específica anti- o pro-inflamatoria. Se ha reportado que algunos microorganismos modulan diferentes proteínas y mediadores moleculares de las vías Wnt para manipular

los procesos celulares y así promover su sobrevida y propagar su invasión^{74,76}, desencadenar fibrosis tisular^{79,90} e incluso cáncer.^{75,77,82,84,89} *M. tuberculosis*, *Ehrlichia chaffeensis* y *Leishmania major* inducen estabilización de β -catenina para promover su sobrevida en macrófagos infectados.^{56,57,115-117} *Helicobacter pylori* y *Cryptosporidium parvum* incrementan la señalización Wnt/ β -catenina y se ha demostrado que esta desregulación puede promover el cáncer gástrico y adenocarcinoma ileo-cecal, respectivamente.^{118,119} Diferentes infecciones virales con CMV, VHB, HPV activan las vías Wnt promoviendo cáncer colonorectal, carcinoma hepatocelular y cáncer cervical, respectivamente.¹²⁰⁻¹²² Con diferentes consecuencias, otros grupos han reportado modulación de las vías Wnt durante la infección por *Bacillus Calmette-Guerin*, *Schistosoma japonicum*, VHC, HIV, *Vaccinia virus* y *herpesvirus*.¹²³⁻¹²⁸

Debido a sus funciones heterogéneas en el desarrollo y en diversas patologías, las proteínas Wnt y el resto de los componentes que participan en las vías de señalización son un blanco interesante para moldear el destino celular. Teniendo en cuenta estos aspectos y su rol en las células del sistema inmune es posible que, durante una patología las vías Wnt pueden participar por un lado desencadenándola y, por otro, controlando los mecanismos del sistema inmune que intentan subsanarla. En este sentido, determinar la naturaleza de la interacción Wnt/Fzd, como así también los blancos moleculares de las vías Wnt, es importante para poder dar lugar a nuevas estrategias terapéuticas.

Formulación de la hipótesis

Las CD_s y Mo tanto humanos como murinos expresan diversos receptores Fzd y pueden secretar proteínas Wnt que son capaces de señalizar tanto a través de las vías Wnt canónica como no canónicas. Varios estudios han hecho énfasis en el importante rol de la señalización Wnt/ β -catenina en estas células debido a su participación en la regulación de respuestas inflamatorias durante infecciones microbianas.^{57,117,129} En CD_s, la activación de la vía Wnt canónica y Wnt/ Ca^{++} se asocia con el desarrollo de un perfil tolerogénico, la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, la inducción de células Treg y la inhibición de la respuesta inmune adaptativa.¹³⁰ Sin embargo, la activación de las vías Wnt en macrófagos, puede tener consecuencias tanto pro- como anti-inflamatorias y diferentes proteínas Wnt secretadas pueden regular otras células del microambiente.^{57,78,131} Las proteínas Wnt y los receptores Fzd son inducidos a través de la señalización de STAT3-, TLR2-, TLR4- y NF- κ B^{59,129,132,133} y además, la estabilización de β -catenina puede estar mediada por mecanismo independientes de proteínas Wnt.⁵⁰⁻⁵² Considerando que TLR2 y TLR4 se encuentran involucrados en el reconocimiento de diferentes componentes de *T. cruzi*¹³⁴, y que estos receptores participan de la expresión de proteínas Wnt, receptores Fzd y la activación de las quinasas AKT y PKA que pueden activar en forma directa β -catenina; la hipótesis de este trabajo de tesis doctoral es que durante la infección por *T. cruzi* la activación de las vías Wnt posee un importante rol en la modulación de la respuesta inflamatoria/tolerogénica y, por lo tanto, regulando el control de la replicación intracelular del parásito, la respuesta inmune y el desarrollo de la cardiopatía asociada a la enfermedad de Chagas crónica.

Justificación de la investigación

La enfermedad de Chagas es un problema sanitario prioritario debido a la falta de una vacuna, de un tratamiento seguro y efectivo y por la persistencia del vector en las áreas endémicas. Como se ha descrito previamente, la patología relacionada a la enfermedad de Chagas, y específicamente el desarrollo de CCC, resulta de una sumatoria de varios factores entre los cuales la persistencia crónica del parásito y el daño inflamatorio del tejido cardíaco son los más importantes. *T. cruzi* y otros patógenos han evolucionado desarrollando estrategias que les permiten manipular los mecanismos inmunoregulatorios del hospedador en su beneficio, asegurando así su sobrevivencia por largos períodos de tiempo.^{14,15} Consecuentemente, durante la infección con *T. cruzi* es necesario que el hospedador establezca, con una cinética precisa, en una primera etapa una respuesta inflamatoria (esencial para que en las fases iniciales de la infección se genere una rápida y efectiva eliminación del parásito) seguida de la activación de los circuitos regulatorios capaces de controlarla (importante en la limitación del daño tisular por la excesiva reacción inflamatoria). Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que orquestan las señales que promueven el control de la replicación intracelular de este parásito, el desarrollo de una efectiva respuesta Th1 y de su apropiada contracción para evitar la inmunopatología, son esenciales.

El esclarecimiento de los mecanismos de regulación de la respuesta inmune específica e inflamatoria que operan durante las infecciones parasitarias permitiría el diseño de estrategias más eficaces en la potenciación de la respuesta protectora y en el control de la respuesta inflamatoria patogénica. La meta final de estos estudios es contribuir al desarrollo de nuevas terapias eficaces para el control de la infección y el desarrollo de patología a largo plazo, que permita mejorar la calidad de vida de millones de individuos que sufren enfermedades causadas por infecciones parasitarias.

Objetivo General

El objetivo general de esta tesis es estudiar la participación de las vías de señalización Wnt en el control de la replicación parasitaria y la regulación de la respuesta inmune durante la infección experimental por *T. cruzi*.

Objetivo específico 1:

Investigar las vías de señalización Wnt que se activan durante la infección con *T. cruzi* e identificar los receptores celulares de tipo TLR y los mediadores solubles que participan en su activación:

- O1.a) Investigar **las proteínas Wnt y los receptores Fzd** que se expresan durante la infección experimental con *T. cruzi*.
- O1. b) Estudiar **la activación de las vías de señalización Wnt** durante la infección de macrófagos con *T. cruzi*.
- O1.c) Identificar **los receptores celulares de tipo TLR y los mediadores solubles** que participan en la activación de las vías Wnt durante la infección de macrófagos con *T. cruzi*.

Objetivo específico 2:

Evaluar la participación de las vías de señalización Wnt en el control de la replicación de *T. cruzi*.

Objetivo específico 3:

Evaluar la participación de las vías de señalización Wnt en la modulación de la respuesta inmune protectora e inflamatoria durante la infección con *T. cruzi*.

- O3.a) Evaluar la participación de las vías de señalización Wnt en la **modulación de la respuesta inmune protectora.**
- O3. b) Evaluar la participación de las vías de señalización Wnt en **el desarrollo de la cardiopatía crónica asociada a la enfermedad de Chagas.**

Resultados

Vías de señalización Wnt que se activan durante la infección con *T. cruzi*, receptores celulares de tipo TLR y mediadores solubles que participan en su activación

Recientemente se ha demostrado que la familia de proteínas Wnt y sus receptores no solo se expresan en células inmunes en desarrollo, sino también en células diferenciadas del sistema inmune innato y adaptativo. CD4 y macrófagos humanos y murinos expresan una variedad de receptores y proteínas Wnt y son susceptibles a la señalización tanto canónica como no-canónica.^{58,135} Así, la señalización Wnt clásicamente considerada como una vía involucrada en el control de la proliferación, migración y diferenciación celular durante el desarrollo, ha comenzado a ser estudiada por su participación en mecanismos inmunomodulatorios durante enfermedades infecciosas como tuberculosis^{57,117} y patologías inflamatorias como sepsis, psoriasis, artritis reumatoidea y aterosclerosis.¹³⁶

Se conoce poco respecto a la inducción y función de las vías Wnt en las células del sistema inmune. Estudios recientes han demostrado que la señalización Wnt puede depender de receptores de la inmunidad innata como los TLR.^{117,132,137-139} Además, se ha demostrado que citoquinas pro-inflamatorias y la activación de NF- κ B pueden estimular la secreción de proteínas Wnt e inducir la expresión de receptores Fz.^{57-59,129,131} En este marco, algunos investigadores plantean que la señalización mediada por TLR podría ser el evento primario que desencadena la respuesta inicial, y que luego seguiría una cascada de señalización que conduciría a la expresión de genes Wnt capaces de activar de manera dual las vías Wnt / β -catenina y Wnt / Ca^{++} para modular la respuesta inflamatoria.^{53,57} Teniendo en cuenta estos datos, que TLR2, TLR4, TLR7 y TLR9 participan en el reconocimiento de diferentes componentes del *T. cruzi*^{4,36,38,134} y que su señalización induce la activación de NF- κ B y la producción de citoquinas pro-inflamatorias; se evaluó si la infección experimental con *T. cruzi* activa las vías de señalización Wnt.

La infección con *T. cruzi* induce la expresión de proteínas de la vía Wnt en esplenocitos de ratones.

Para evaluar si la infección experimental con *T. cruzi* induce la producción de proteínas Wnt y la activación de β -catenina, la expresión de las proteínas Wnt más comúnmente asociadas con inflamación como Wnt3a, Wnt5a y de β -catenina fue determinada por

Western blot en homogenato total de esplenocitos de ratones B6 infectados a diferentes tiempos post-infección (pi). La Fig. 10 muestra que a medida que la infección progresa, se regula positivamente la expresión de Wnt3a, Wnt5a y se induce la acumulación de β -catenina en células de bazo de los ratones infectados. Teniendo en cuenta la acumulación de β -catenina, estos resultados sugieren que el reconocimiento de *T. cruzi* induce en las células del bazo la secreción de proteínas Wnt que pueden señalar para activar la vía canónica Wnt/ β -catenina.

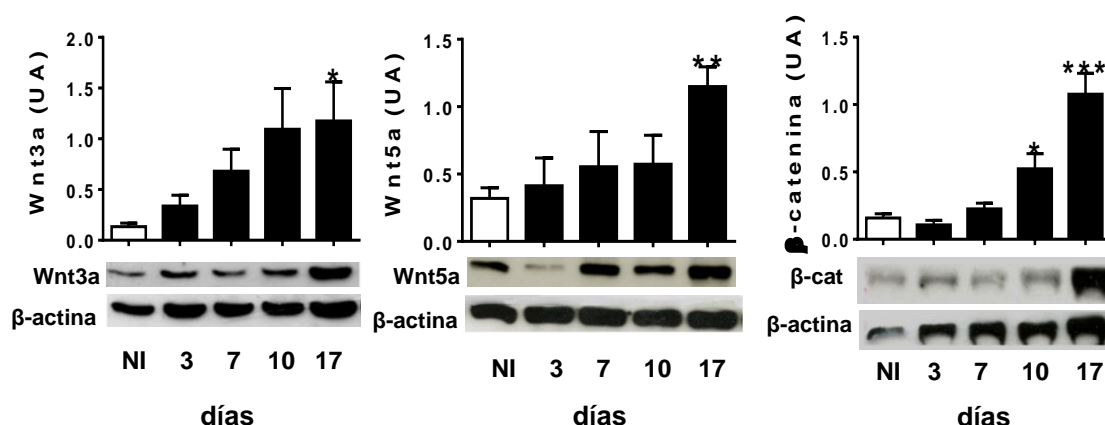


Figura 10 | La infección con *T. cruzi* induce la expresión de proteínas de las vías Wnt en células de bazo de ratones infectados.

Ratones B6 fueron infectados con *T. cruzi* y la expresión de Wnt3a, Wnt5a y β -catenina fue determinada en células mononucleares de bazo por Western blot a diferentes tiempos post-infección (pi). Células mononucleares de bazo de ratones sin infectar fueron utilizadas como control (NI). Las barras representan el promedio \pm SEM del nivel de expresión de cada proteína normalizada a los niveles de expresión de β -actina, n=5/tiempo pi. La significancia fue calculada utilizando el test ANOVA, * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001.

La infección de macrófagos con *T. cruzi* modula la expresión de genes y proteínas de las vías de señalización Wnt.

A los fines de determinar cambios en la expresión de los múltiples y diferentes componentes de las distintas vías Wnt inducidos en macrófagos por la infección con *T. cruzi*, macrófagos diferenciados de médula ósea (BMM) de ratones B6 fueron infectados *in vitro* con tripomastigotes (Tps) de *T. cruzi* para evaluar el perfil de expresión de 84 genes relacionados a la señalización Wnt utilizando un q-RT-PCR-Array. Previo a este ensayo, y como control positivo de la infección, se evaluó por q-RT-PCR la expresión del transcripto de la enzima iNOS (*Nos2*), que como ha sido previamente descrito, se induce en BMM luego de la infección con *T. cruzi* (Fig. 11A).²² La Fig. 11B muestra que a 12 h

pi se incrementó la transcripción de genes relacionados principalmente con la señalización canónica tales como β -catenina (*Ctnnb1*), genes que codifican para factores que son esenciales para la formación del complejo transcripcional de β -catenina (*Tcf7*, *Tcf7l1*, *Bcl9*), como así también de genes blanco de esta vía de activación (*Axin1*, *Axin2*, *Wisp1*, *Ccnd1*, *Ccnd2*); mientras que la transcripción de genes que codifican para los componentes del complejo de destrucción de β -catenina, *Apc* y *Gsk3b*, fue inhibida por la infección, indicando la activación de la vía Wnt canónica a 12 h pi.

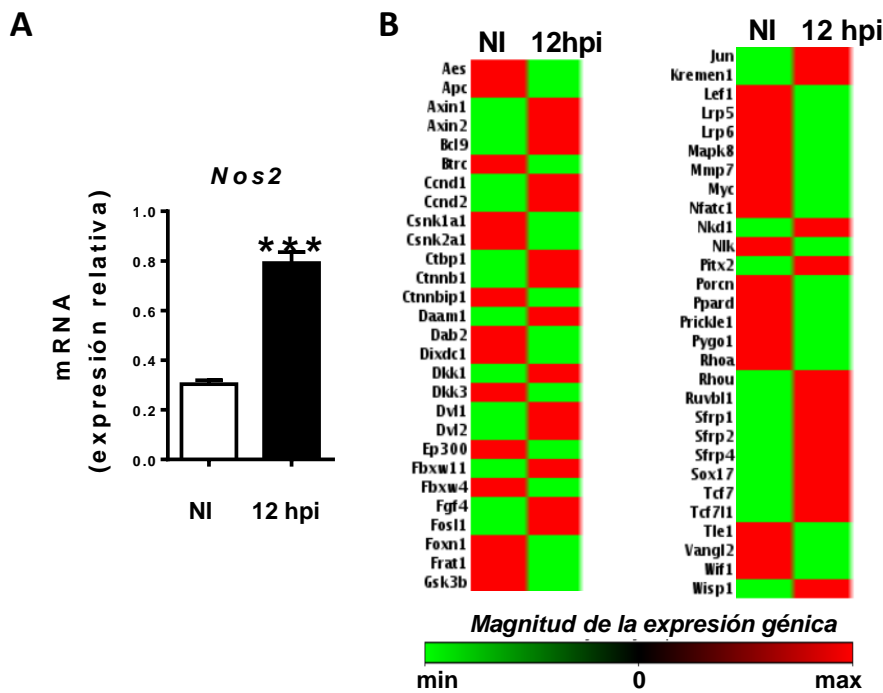


Figura 11 | La infección de macrófagos con *T. cruzi* modula la transcripción de genes que codifican para los diferentes componentes de las vías de señalización Wnt.

BMM de ratones B6 fueron infectados *in vitro* por 12 h con Tps de *T. cruzi* (Tps / BMM=3:1) o tratados con medio de cultivo como control (NI). **A**) Expresión de *Nos2* normalizada a la expresión de GAPDH mediante q-RT-PCR. **B**) Expresión de genes que codifican para diferentes componentes de las vías Wnt analizada por q-RT-PCR utilizando PAMM-043ZC RT2 Profiler TM PCR Array (Qiagen). La expresión relativa de cada gen fue normalizada utilizando 4 genes de expresión constitutiva establecidos en la plataforma de análisis de Qiagen. Se representan los resultados obtenidos en una muestra de BMM infectados (12 hpi) y otra de no-infectados (NI).

Para confirmar estos resultados, se determinó en BMM de ratones B6 infectados con Tps de *T. cruzi* en idénticas condiciones *in vitro* la expresión de los transcritos y proteínas de Wnt3a y Wnt5a por q-RT-PCR y Western blot, respectivamente. Las Fig. 12A y B muestran que la infección induce la expresión tanto de los transcritos como de las proteínas Wnt3a y Wnt5a. Además, la determinación de los niveles de transcritos correspondientes a los receptores Fzd que más fuertemente interaccionan con Wnt3a y

Wnt5a como *Fzd4*, *Fzd6*, *Fzd8* y *Fzd9*¹⁴⁰, reveló que tan temprano como 5 minutos pi, se produce un incremento en la transcripción de sus correspondientes genes (Fig. 12C). En conjunto, estos hallazgos sugieren que luego del reconocimiento del parásito *T. cruzi* por estas células de la inmunidad innata, comienza la transcripción de proteínas Wnt que podrían señalar a través de receptores Fzd para activar las vías de señalización Wnt.

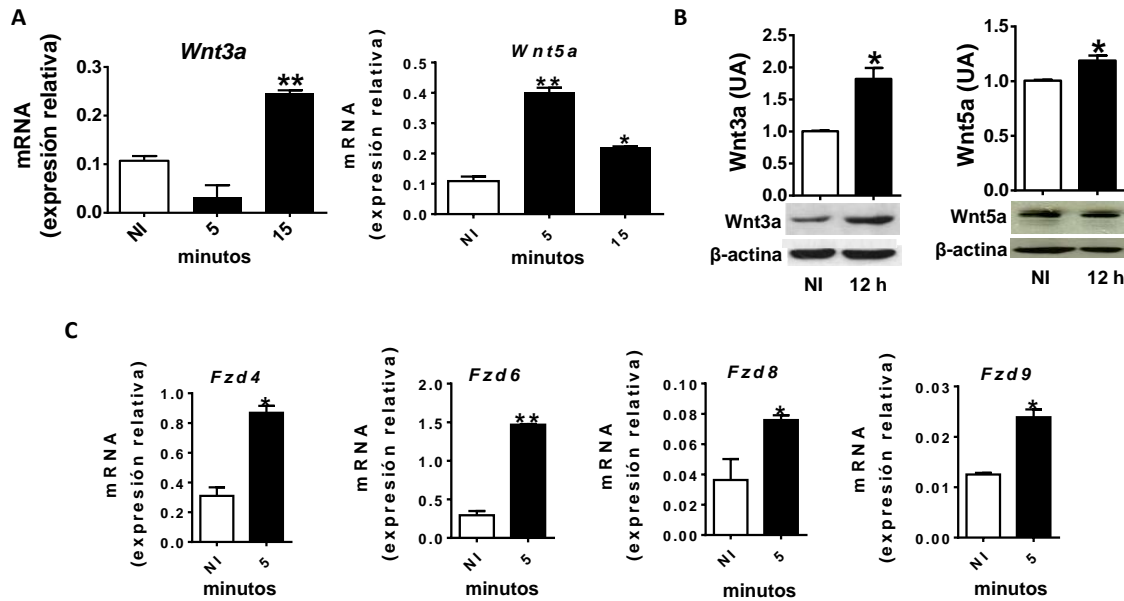


Figura 12 | La infección experimental con *T. cruzi* induce la expresión de proteínas Wnt y receptores Fzd en macrófagos.

BMM de ratones B6 fueron infectados *in vitro* por 12 h con Tps de *T. cruzi* (Tps / BMM=3:1) o tratados con medio de cultivo como control. A diferentes tiempos pi (indicados en la figura) se evaluó la expresión de proteínas Wnt y receptores Fzd. **A)** Niveles de mRNA de Wnt3a y Wnt5a relativos a β -actina determinada por q-RT-PCR. **B)** Abundancia relativa de Wnt3a, Wnt5a y β -actina en los lisados celulares determinada por Western blot y densitometría a las 12 hpi. **C)** Expresión de mRNA para Fzd4, Fzd6, Fzd8 y Fzd9 relativa a β -actina determinada por q-RT-PCR. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados. Se grafica la media \pm SEM. UA: unidades arbitrarias. La significancia fue calculada en A utilizando ANOVA y en B y C mediante el test t de Student, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

La infección con *T. cruzi* induce primero la activación de la vía Wnt / β -catenina y posteriormente de la vía Wnt / Ca^{++} en macrófagos.

A los fines de determinar si la infección por *T. cruzi* activa la señalización Wnt canónica en BMM, se estudió la cinética de expresión del mRNA que codifica para β -catenina como así también su expresión proteica y translocación al núcleo a distintos tiempos pi. A tiempos tan cortos como 5 min pi, se observó un incremento significativo en la transcripción del gen que codifica para β -catenina (*Ctnnb1*), mientras que la expresión de

la proteína y su translocación hacia el núcleo comienza alrededor de las 2 h pi y alcanza un máximo alrededor de las 12 h pi (Fig.13A y B). Además, el aumento de β -catenina nuclear, se correlaciona con el incremento en la transcripción de genes dependientes de β -catenina como *Wisp1*, *Axin1* y *Ccnd1* (Fig. 13C). La acumulación de β -catenina fue también evidente en macrófagos peritoneales (MP) de ratones B6 luego de 24 h pi (Fig. 13D). En conjunto, estos resultados demuestran que tanto *in vitro* como *in vivo*, la infección por *T. cruzi* está asociada en macrófagos con una significativa activación de genes y expresión de proteínas involucradas en la señalización Wnt canónica.

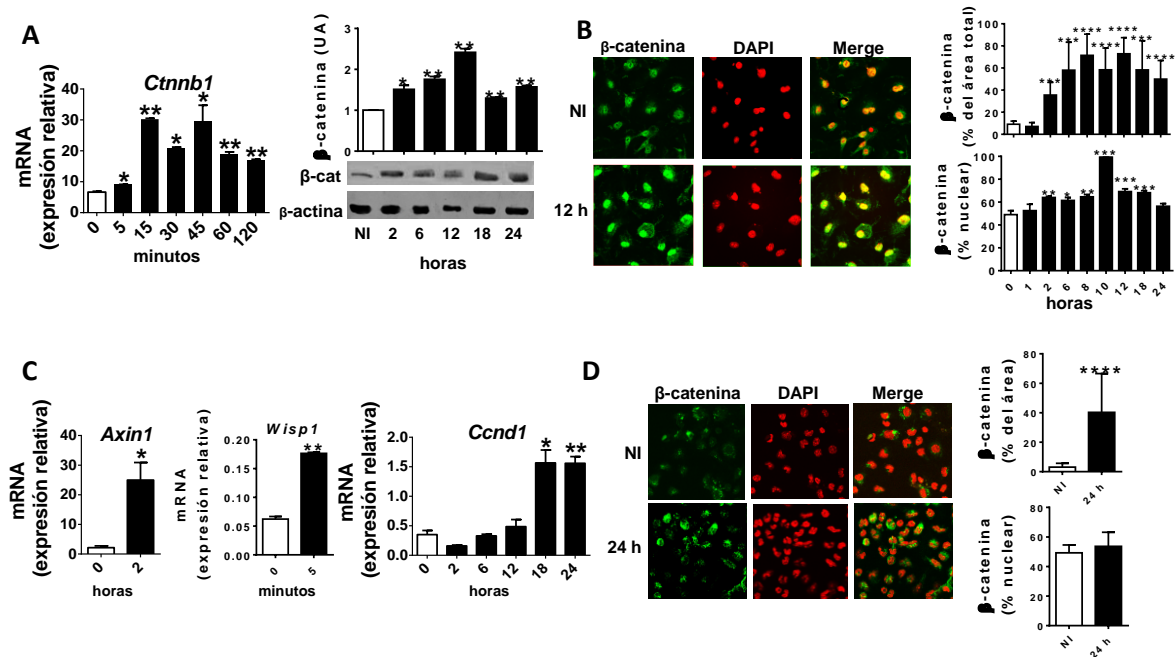


Figura 13 | La infección con *T. cruzi* activa la vía Wnt/ β -catenina en macrófagos.

BMM de ratones B6 fueron infectados por 12 h con Tps de *T. cruzi* (Tps / BMM=3:1) o tratados con medio de cultivo como control (NI). **A)** Niveles de *Ctnnb1* y de β -catenina determinados por q-RT-PCR y Western blot, respectivamente, a diferentes tiempos pi. **B)** Expresión y localización de β -catenina analizada por inmunofluorescencia y microscopía confocal de exploración láser. **C)** Expresión relativa de mRNA de diferentes genes target de β -catenina: *Axin1*, *Wisp1* y *Ccnd1* analizada por q-RT-PCR. Los niveles de mRNA fueron normalizados con la expresión del mRNA de β -actina. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados. Se grafica la media \pm SEM. **D)** Macrófagos peritoneales fueron obtenidos de ratones B6 sin infectar o infectados con *T. cruzi* luego de 24 hpi, y los niveles de expresión y localización de β -catenina fueron evaluados mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. En los paneles (**B,D**), se muestra un campo representativo de cada grupo (1200 X). La tinción nuclear fue detectada con 4',6-diamino-2fenilindol (DAPI), y los niveles de expresión de β -catenina (% del área total) y el coeficiente de co-localización de Mander's (% nuclear) fueron calculados utilizando el programa FIJI/ImageJ. Verde : β -catenina, Rojo : DAPI. La significancia fue calculada en **A y B** utilizando el test t de Student y en **C y D** mediante ANOVA, * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001.

Posteriormente se evaluó el efecto de la infección en la activación de la vía Wnt / Ca^{++} . Para ello, se analizó la expresión de la forma activa de CAMKII fosforilada en Treonina-286 (Thr286-CAMKII) y la expresión y translocación nuclear del factor de transcripción NFATc1. La Fig. 14A muestra que la infección por *T. cruzi* induce un incremento en la

expresión de la forma activa de CAMKII a partir de las 12 h pi. Además, a partir de las 18 h pi, se evidenció la activación del factor de transcripción NFATc1, detectado como un grupo de bandas proteicas más livianas de migración rápida (Fig. 14B, flechas) que son características de la desfosforilación de NFATc1 inducida por Calcineurina (modificación que induce su translocación al núcleo). La activación de NFATc1 se observó también en ensayos de inmunofluorescencia donde se pudo observar el incremento en su expresión y su translocación hacia núcleo celular (Fig. 14C).

El ingreso de *T. cruzi* a la célula hospedadora y la formación de la vacuola parasitófora induce en las células infectadas un aumento en los niveles intra-citoplasmáticos de Ca^{++} . Si bien no se ha dilucidado el mecanismo por el cual ocurre esta movilización del Ca^{++} intracelular, se conoce que es un paso necesario para la infección celular temprana por este microorganismo¹⁴¹⁻¹⁴³. Teniendo esto en cuenta, es posible que la activación de CAMKII y NFATc1 observada en nuestro modelo experimental sea el resultado de la señalización de otras múltiples vías, diferentes de la vía Wnt / Ca^{++} que nos interesa estudiar. A los fines de establecer si la activación de CAMKII y NFATc1 observada en BMM a partir de las 12 y 18 h pi respectivamente, es dependiente de la señalización Wnt / Ca^{++} , se inhibió 24 h antes de la infección la secreción de proteínas Wnt utilizando IWP-L6, un inhibidor de la O-acil-transferasa encargada de las modificaciones post-traduccionales necesarias para la secreción de las proteínas Wnt¹⁴⁴. La Fig. 15A muestra que en ausencia de proteínas Wnt no se observa el aumento en la expresión de Thr286-CAMKII ni la activación de NFATc1. En estos experimentos se utilizó ionomicina como control positivo de la movilización intracelular de Ca^{++} . Estos resultados demuestran que la infección por *T. cruzi* induce la activación de la vía Wnt / Calcio en macrófagos. Por otra parte, este último experimento permitió comprobar que la secreción de proteínas Wnt es necesaria para la acumulación y translocación de β -catenina al núcleo celular de BMM infectados a 12 h pi (Fig. 15B), ya que la previa incubación de los BMM con IWP-L6 inhibió la acumulación de β -catenina que se puede observar en los BMM solo infectados (Control). La activación de BMM con LPS en combinación con IFN- γ recombinante se utilizó como control positivo de la activación de β -catenina en este experimento.

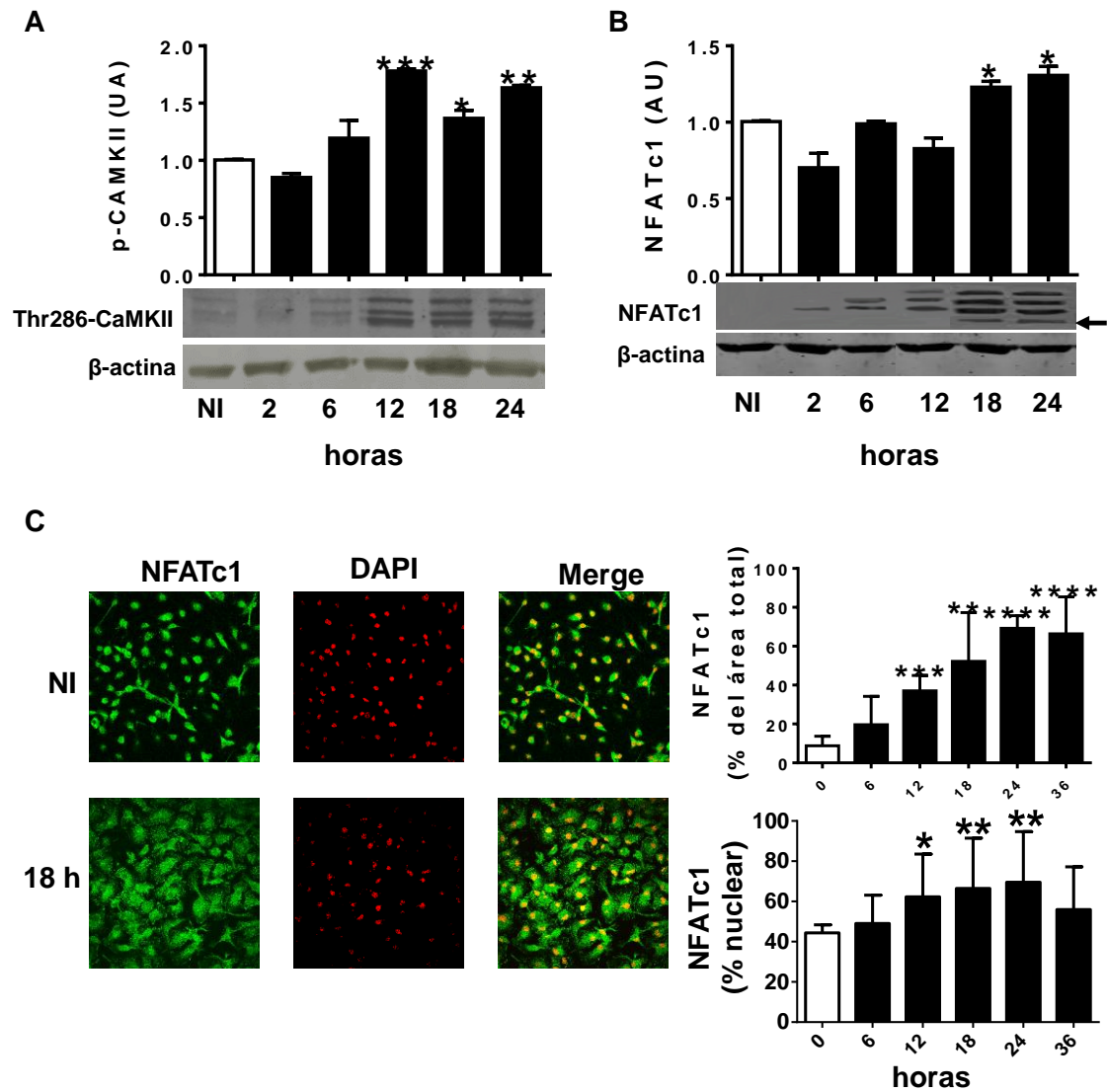


Figura 14 | La infección experimental con *T. cruzi* activa la señalización mediada por Ca⁺⁺ en macrófagos.

BMM fueron utilizados como control (NI) o infectados *in vitro* con tripomastigotes de *T. cruzi* (1:3) y luego se evaluó la activación de CAMKII inducida por calmodulina y la activación de NFATc1 a diferentes tiempos pi. Se muestra **A**) la expresión de la fosforilación de CAMKII (Thr286-CAMKII) y **B**) la expresión de NFATc1 analizadas por Western blot y normalizadas respecto a la expresión de β -actina. **C**) Expresión y localización de NFATc1 evaluada por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Se muestra un campo representativo por cada grupo (1200X). La tinción nuclear fue detectada con DAPI, y los niveles de expresión de NFATc1 (% del área total) y el coeficiente de co-localización de Mander's (% nuclear) fueron calculados utilizando el programa FIJI/ImageJ. Verde : NFATc1, Rojo : DAPI. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados. Se grafica la media \pm SEM. Abreviación UA: unidades arbitrarias. La significancia fue calculada utilizando ANOVA, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

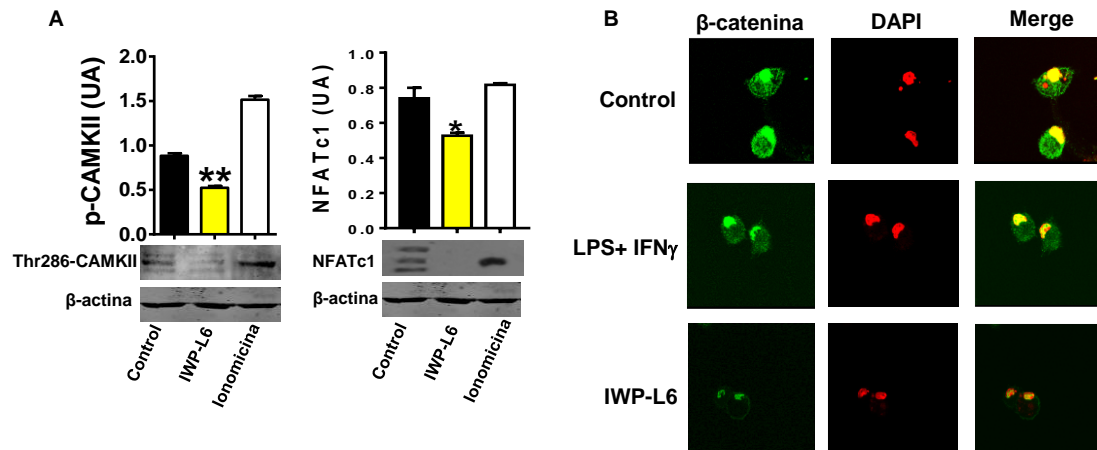


Figura 15 | La infección experimental con *T. cruzi* activa primero la vía Wnt / β -catenina y luego la Wnt / Ca^{++} en macrófagos.

BMM fueron tratados por 24 h con el inhibidor IWP-L6 o con vehículo (Control) y luego infectados con Tps de *T. cruzi* (1:3). **A**) Expresión de Thr286-CAMKII y NFATc1 analizadas por Western blot a las 18 hpi y normalizadas respecto a la expresión de β -actina. **B**) Expresión de β -catenina a las 12 hpi determinada por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Se muestra un campo representativo por cada grupo (1200X). Verde: β -catenina, Rojo: DAPI. BMM tratados con Ionomicina (1 μ M, 20 min) fueron utilizados como control positivo para la expresión de Thr286-CAMKII y NFATc1 mientras que LPS (10 μ g/mL) más IFN- γ (10 ng/mL) se utilizó como control positivo de la expresión de β -catenina. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados. Se grafica la media \pm SEM. La significancia fue calculada utilizando ANOVA, * p <0.05; ** p <0.01. UA: unidades arbitrarias.

La activación de NFATc1, determinada como traslocación al núcleo celular por inmunofluorescencia, no fue evidente en MP de ratones a las 24 h pi (Fig. 16).

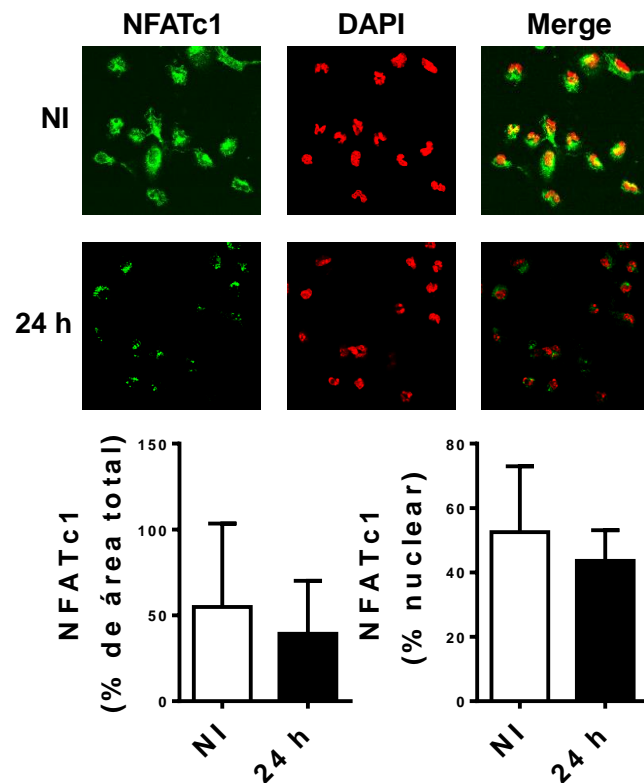


Figura 16 | Expresión de NFAT en macrófagos peritoneales luego de 24 horas de infección con *T. cruzi*.

Macrófagos peritoneales fueron obtenidos de ratones B6 sin infectar o infectados con *T. cruzi* luego de 24 hpi y los niveles de expresión y localización de NFATc1 fueron evaluados mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Se muestra un campo representativo de cada grupo (1200X). La tinción nuclear fue realizada empleando DAPI y los niveles de expresión de NFATc1 (% del área total) y el coeficiente de colocalización de Mander's (% nuclear) fueron calculados utilizando FIJI/ImageJ. Verde: NFATc1, Rojo: Núcleos. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados. Se grafica la media \pm SEM. La significancia fue calculada utilizando el test *t* de Student.

Sin embargo, tanto la acumulación de β -catenina como la activación de NFATc1 fue significativamente mayor en MP de ratones infectados a los 18 d pi vs MP de animales controles NI (Fig. 17A y B). Con el objetivo de determinar el rol de las proteínas Wnt para activar las vías Wnt canónica y Wnt/ Ca^{++} en MP durante la infección con *T. cruzi*, ratones B6 infectados fueron tratados intra-peritonealmente (ip) con IWP-L6 (7,5mg/kg, concentración utilizada por Hong y col.¹⁴⁵ para determinar el efecto de las proteínas Wnt en un modelo experimental de cáncer) en los días 5; 8; 11 y 14 pi mientras que ratones tratados con vehículo (DMSO) fueron utilizados como control (Fig. 18). La Fig. 17A y B (panel de la derecha) muestra que a los 18 d pi en ausencia de proteínas Wnt no se produce la acumulación de β -catenina ni la activación de NFATc1 en MP de ratones infectados indicando que in vivo, al igual que lo observado para BMM, la secreción de proteínas Wnt es necesaria para el mantenimiento de la activación de las vías Wnt canónica y no canónica dependiente de Ca^{++} .

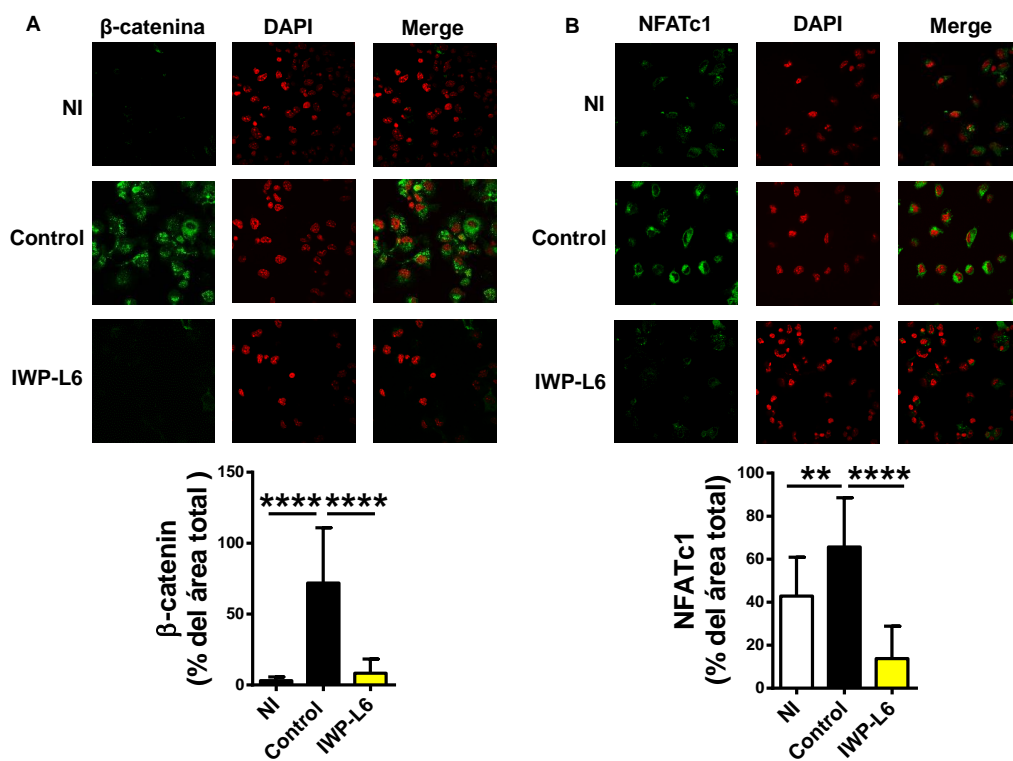


Figura 17 | La activación de la vía Wnt/ y Wnt/ Ca^{++} en macrófagos peritoneales de ratones infectados con *T. cruzi* es dependiente de la secreción de proteínas Wnt.

Ratones B6 infectados con *T. cruzi* fueron tratados con IWP-L6 durante la etapa aguda de la infección y luego de 18 días se obtuvieron macrófagos peritoneales (MP). La expresión de β -catenina y NFATc1 se determinó por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Un campo representativo de cada grupo es mostrado (NI, ratones no-infectado; Control, ratones infectados tratados con vehículo; IWP-L6, ratones infectados tratados con IWP-L6) (1200X). La tinción nuclear fue realizada con DAPI y los niveles de expresión de β -catenina y NFATc1 (% de área total) fueron calculados utilizando FIJI/ImageJ. Verde: β -catenina ó NFATc1, Rojo: Núcleos. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados. Se grafica la media \pm SEM. La significancia fue calculada utilizando ANOVA, ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

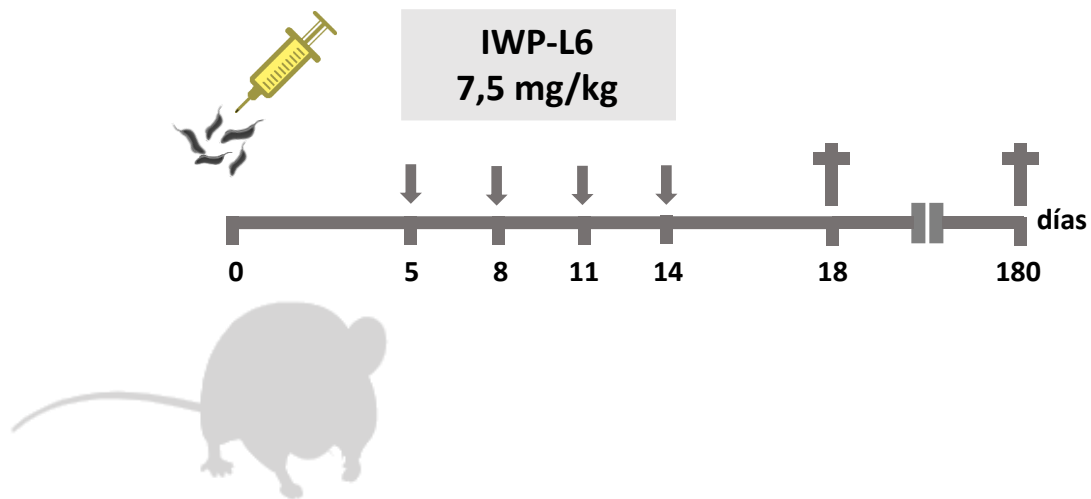


Figura 18 | Modelo experimental de tratamiento con IWP-L6.

Los ratones infectados fueron tratados en los días 5; 8; 11 y 14 pi con IWP-L6 (7,5 mg/kg) o vehículo (DMSO) y sacrificados para los diferentes estudios en la etapa aguda (día 18 pi) o crónica (día 180 pi).

La señalización mediada por TLR2 y TLR4 es crucial para la acumulación de β -catenina en macrófagos infectados con *T. cruzi*.

En la Fig.s 14 y 15 se muestra que la acumulación de β -catenina es un evento muy temprano, lo que sugiere que podría ser gatillado luego del reconocimiento de diferentes moléculas del parásito por los receptores de la inmunidad innata de los macrófagos en el momento de la infección. Se ha demostrado que la activación de β -catenina, su traslocación al núcleo y su interacción con los factores de transcripción TCF/LEF puede ocurrir, en determinados contextos, en respuesta a mecanismos no canónicos (Wnt-independientes). En este sentido, las proteínas quinasas AKT y PKA pueden ambas estabilizar a β -catenina induciendo su fosforilación en la Serina 552 (p-Ser552- β -catenina)^{146,147}, mientras que además PKA puede también estabilizar a esta enzima por fosforilación en la Serina 675 (p-Ser675- β -catenina)¹⁴⁸. Además, se ha reportado que AKT puede activar a β -catenina de forma indirecta mediante la inactivación de GSK-3 β por fosforilación en serina 9 (p-Ser9-GSK3 β).¹⁴⁹ Como resultado de estas fosforilaciones, β -catenina transloca hacia el núcleo celular e inicia la transcripción de diferentes genes blanco.

La cascada de señalización dependiente de AKT es activada por una variedad de receptores celulares entre los que se encuentran los receptores de tirosina quinasas, integrinas, receptores de células B y T, receptores de citoquinas, TLR, receptores

acoplados a proteínas-G y otros estímulos que inducen la producción de PIP3 por la quinasa PI3K^{149,150}. Por su parte, PKA se activa por el incremento de AMPc, un segundo mensajero que media la señalización de receptores de transmembrana acoplados a proteína G por diferentes hormonas, factores de crecimiento, eicosanoides¹⁵¹ y de receptores de algunas citoquinas como IL-13¹⁵² o IFN- γ ¹⁵³. La unión de AMPc a la serina/treonina-quinasa PKA activa su capacidad catalítica e induce la fosforilación de proteínas blanco que participan en la regulación de diferentes procesos fisiológicos.

Teniendo en cuenta que AKT y PKA pueden ser activadas por receptores TLR y que además se ha demostrado que se activan luego de la infección por *T. cruzi*, en el contexto de la infección de macrófagos *in vitro* con *T. cruzi*, la estabilización temprana de β -catenina podría ser el resultado del reconocimiento de componentes del parásito por diferentes TLR y/o de la señalización por citoquinas. Así, a tiempos muy tempranos pi, el incremento de Ser552- β -catenina podría indicar la activación mediada AKT y PKA mientras que el incremento de Ser675- β -catenina indicaría su activación mediada por PKA.^{61,154,155}

A fines de evaluar si durante la infección experimental con *T. cruzi* el reconocimiento de componentes del parásito por receptores TLR induce la acumulación de β -catenina en Mo, se determinó la expresión de β -catenina en BMM derivados de ratones B6 salvajes (WT), deficientes en TLR2 (TLR2^{-/-}) o deficientes en TLR4 (TLR4^{-/-}) a diferentes tiempos pi. La infección experimental con *T. cruzi* reguló positivamente la expresión de β -catenina en BMM de ratones WT a tiempos tan tempranos como 2 h pi mientras que, en BMM de ratones deficientes en TLR2 o TLR4, β -catenina se mantuvo en niveles similares a los observados en ausencia de infección (Fig. 19), indicando que el reconocimiento de *T. cruzi* por TLR2 y TLR4 es necesario para la acumulación temprana de β -catenina.

Posteriormente, y a los fines de indagar en los mecanismos de activación temprana de β -catenina, se determinaron los niveles de expresión de p-Ser552- β -catenina y p-Ser675- β -catenina en BMM WT a diferentes tiempos pi. La Fig. 20A muestra que luego del reconocimiento del parásito y hasta las 6 h pi se produce un marcado incremento de p-Ser552- β -catenina y un leve incremento de p-Ser675- β -catenina (Fig. 20A). Además, mediante el fraccionamiento del extracto proteico citoplasmático y nuclear, y posterior Western blot, se pudo determinar que a las 12 h pi, p-Ser552- β -catenina se encuentra en el núcleo celular (Fig. 20B).

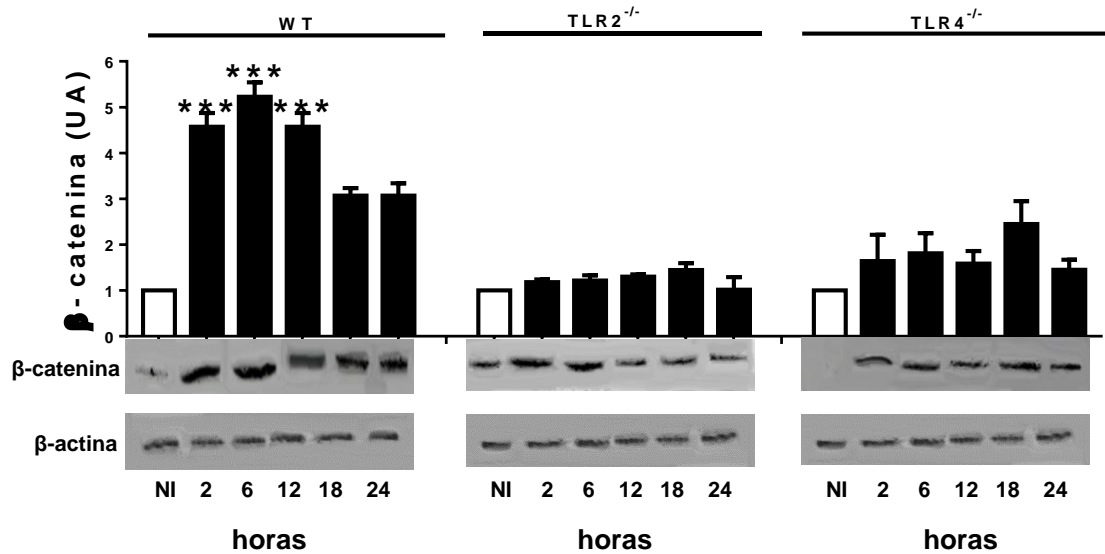


Figura 19 | TLR2 y TLR4 son ambos necesarios para la activación de β -catenina. BMM de ratones salvajes (WT) o deficientes en TLR2 (TLR2^{-/-}) ó TLR4 (TLR4^{-/-}) fueron utilizados como control (NI) o infectados *in vitro* con Tps de *T. cruzi* (1:3). La expresión de β -catenina se evaluó por Western blot y se normalizó respecto a la expresión de β -actina a diferentes tiempos pi. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados. Se grafica la media \pm SEM. La significancia fue calculada utilizando ANOVA, * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001. UA: unidades arbitrarias.

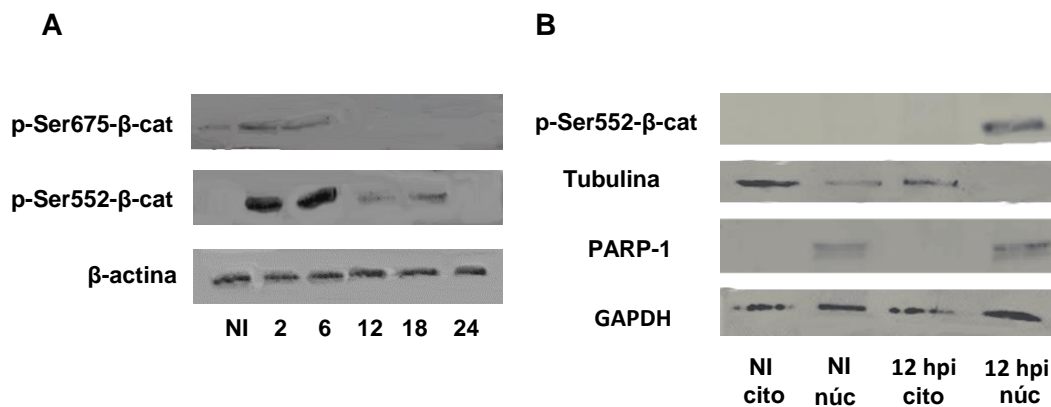


Figura 20 | Expresión de p-Ser552- β -catenina y de p-Ser675- β -catenina en macrófagos infectados con *T. cruzi*.

BMM de ratones WT fueron infectados *in vitro* con Tps de *T. cruzi* (1:3). BMM no infectados fueron utilizados como control (NI). **A)** Expresión β -catenina fosforilada en Ser675 y Ser552 evaluada por Western blot y normalizada respecto a la expresión de β -actina a diferentes tiempos pi. **B)** Localización de p-Ser552- β -catenina a las 12 hpi evaluada en extractos de núcleo y citoplasma mediante Western blot utilizando tubulina como control de carga citoplasmático y PARP-1 como control de carga nuclear. Se muestran los resultados de un experimento representativo de dos experimentos independientes realizados.

En conjunto estos resultados sugieren que el reconocimiento del parásito por TLR2 y TLR4 generaría las señales necesarias para la activación de ambas quinasas, AKT y PKA, que participan en la estabilización de β -catenina por fosforilación, principalmente, en Ser552. A los fines de testear esta hipótesis, se evaluó la expresión temprana p-Ser552- β -catenina en BMM derivados de ratones WT, TLR2^{-/-} y TLR4^{-/-}. La Fig. 21 muestra la expresión de β -catenina total y p-552- β -catenina a diferentes tiempos pi en BMM de ratones WT y deficientes en TLR2 y TLR4, y demuestra que en ausencia de señalización dependiente de TLR no se produce ni la acumulación de β -catenina, ni su fosforilación en Ser-552.

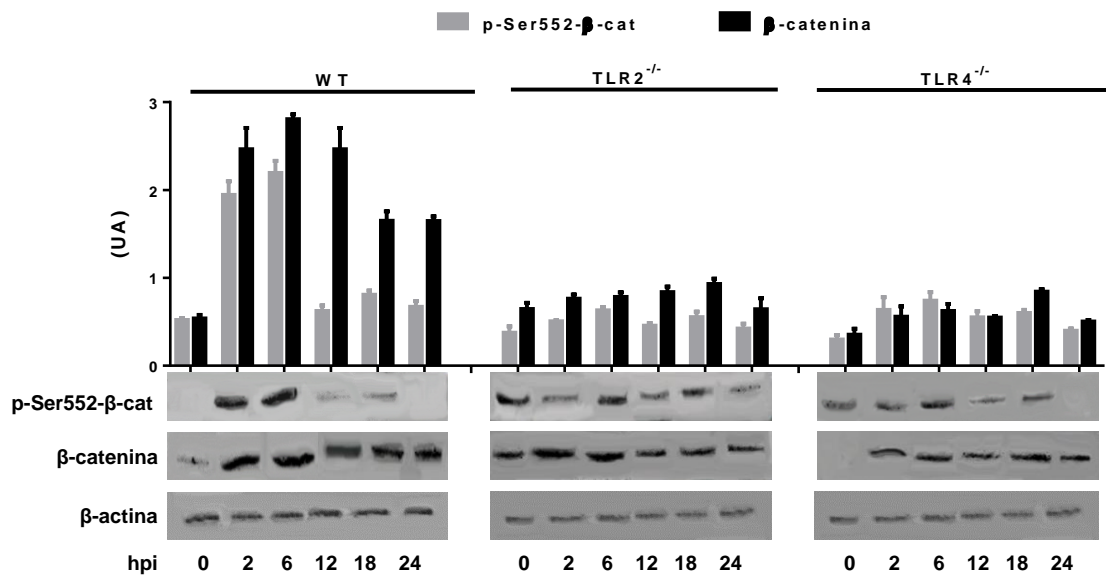


Figura 21 | La acumulación de p-Ser552- β -catenina luego de la infección de BMM con *T. cruzi* es dependiente de la señalización mediada por TLR2 y TLR4 .

BMM de ratones WT o deficientes en TLR2 (TLR2^{-/-}) ó TLR4 (TLR4^{-/-}) fueron infectados *in vitro* con Tps de *T. cruzi* (1:3). La expresión de p-Ser552- β -catenina y β -catenina total a diferentes tiempos pi fue evaluada por Western blot. BMM sin infectar de cada cepa fueron utilizados como control (NI). La expresión de ambas formas de β -catenina fue evaluada por Western blot y normalizada respecto a la expresión de β -actina. Se muestran los resultados de un experimento representativo de dos experimentos independientes realizados. Se grafica la media \pm SEM. La significancia fue calculada utilizando ANOVA, * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001. UA: unidades arbitrarias

Se ha observado que en ausencia de secreción de proteínas Wnt (tratamiento con IWP-L6, Fig.s 17A y B) no se produce la acumulación de β -catenina en macrófagos infectados con *T. cruzi*. A los fines de determinar si la secreción de proteínas Wnt es necesaria para la fosforilación de β -catenina en Ser552, se determinó a diferentes tiempos pi la expresión de p-552- β -catenina en BMM tratados con IWP-L6 y luego infectados. La Fig. 22, muestra que en ausencia de ligandos Wnt, no se produce la fosforilación de β -catenina inducida por AKT y PKA en Ser552. Estos resultados sugieren que, a pesar de

que se ha reportado que la activación de AKT y PKA por la señalización a través de receptores TLR es suficiente para estabilizar β -catenina por fosforilación en Ser552, sería necesaria la señalización por ligandos Wnt para asegurar la disponibilidad de β -catenina en el citoplasma celular para que ésta sea luego fosforilada por AKT y PKA. Experimentos que permitirán caracterizar la vía de activación de β -catenina mediada por AKT y PKA post-reconocimiento de receptores TLR, como la determinación de la expresión p-Ser552-, p-675- β -catenina y p-Ser9-GSK3 β a tiempos más cortos pi están siendo desarrollados actualmente en el laboratorio.

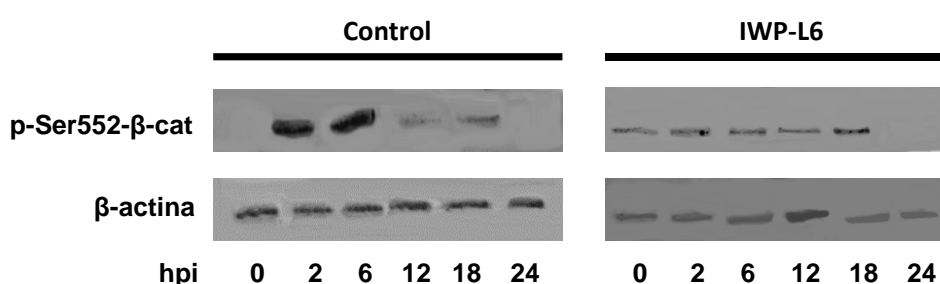


Figura 22 | La secreción de proteínas Wnt es necesaria para que β -catenina se fosforile en la Ser 552.

BMM de ratones WT tratados con IWP-L6 (7,5 mg/kg) o vehiculo (Control) 24 h antes de ser infectados con Tps de *T. cruzi* (1:3). A diferentes tiempos pi se determinó por Western blot la expresión de p-Ser552- β -catenina. Como control de carga se utilizó β -actina. Se muestran los resultados de un experimento representativo de dos experimentos independientes realizados.

Rol de citoquinas en la acumulación de β -catenina en macrófagos infectados con *T. cruzi*.

A fines de dilucidar si la señalización de citoquinas secretadas por macrófagos infectados con *T. cruzi* participa en la acumulación de β -catenina en estas células, se evaluó la expresión de β -catenina a las 12 h pi (tiempo en el cual se observa el máximo aumento de β -catenina) en BMM derivados de ratones WT y deficientes para la producción de IL-6 (IL6^{-/-}), IL-10 (IL10^{-/-}), IL-1 β (NLRP3^{-/-}) e IFN- γ (IFN γ ^{-/-}) o carentes de receptores para TNF (TNFRA^{-/-}) e IFN-I (IFNAR^{-/-}). La Fig. 23, muestra que tanto los BMM de ratones WT como de animales IL-6^{-/-}, IL-10^{-/-}, NLRP3^{-/-} y TNFRA^{-/-} acumulan β -catenina luego de 12 h pi. Es interesante notar, que mientras BMM de ratones WT, IL-6^{-/-}, NLRP3^{-/-} y TNFRA^{-/-} incrementaron alrededor de 2 veces la expresión de β -catenina a las 12 h pi, los provenientes de ratones IL-10^{-/-} lo hacen cuatro veces, sugiriendo que durante la infección

con *T. cruzi* la producción de IL-10 regula negativamente la activación de β -catenina. De manera interesante, la Fig. 23 también muestra que en ausencia de IFN- γ y del receptor para interferones tipo I, los BMM expresan, en ausencia de infección, entre 5 y 6 veces más β -catenina que los BMM WT mientras que la acumulación de esta proteína no se modificó por la infección. Estos últimos resultados sugirieren un importante rol de la señalización fisiológica por receptores de interferones en la regulación negativa de la activación de β -catenina en macrófagos que podrá ser explorada en el futuro.

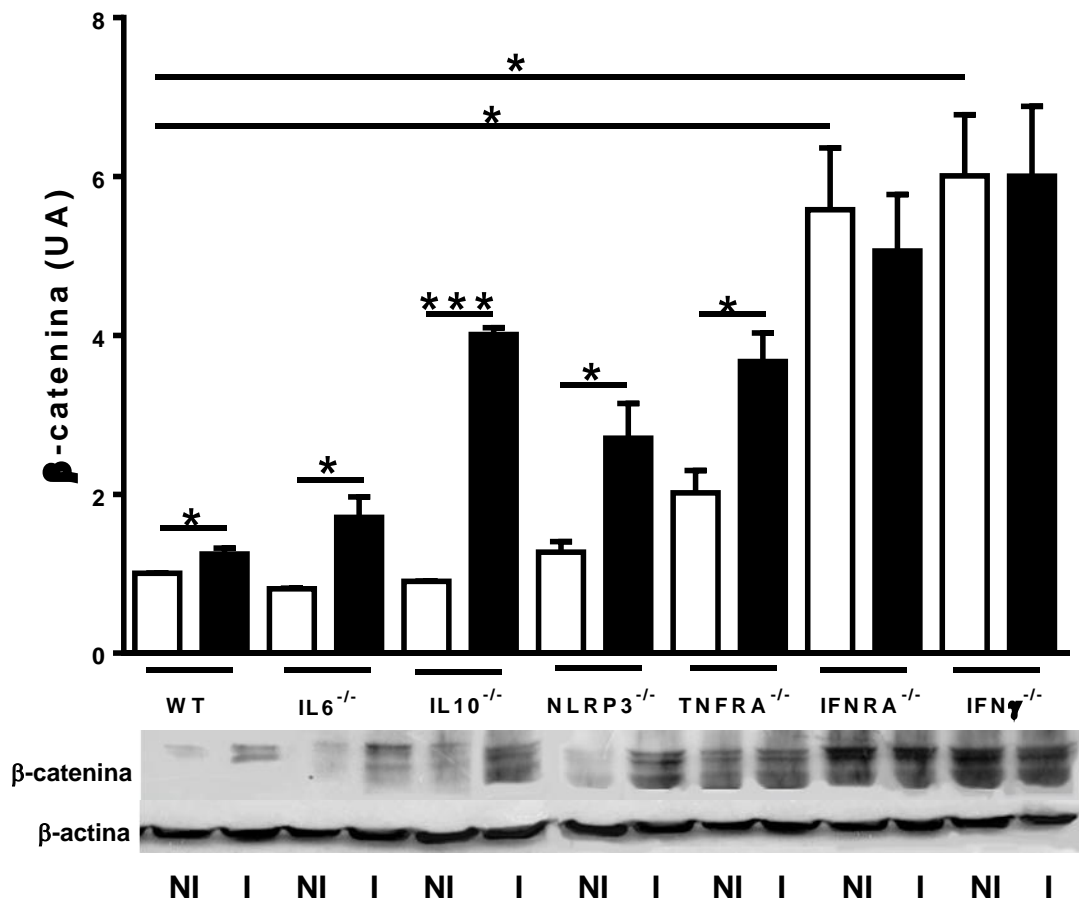


Figura 23 | Rol de las citoquinas en la activación de β -catenina en macrófagos infectados con *T. cruzi*.

Se evaluó la expresión de β -catenina en BMM de ratones WT, deficientes para la producción de IL-6 (IL6^{-/-}), IL-10 (IL10^{-/-}), IL-1 β (NLRP3^{-/-}) e IFN- γ (IFN γ ^{-/-}) o carentes de receptores para TNF (TNFRA^{-/-}) e IFN-I (IFNAR^{-/-}) sin infectar (NI) o infectados con Tps de *T. cruzi* (1:3) luego de 12 h pi (I) mediante Western blot y normalizada respecto a la expresión de β -actina. Se muestran los resultados de un experimento representativo de dos experimentos independientes realizados. Se grafica la media \pm SEM. La significancia fue calculada utilizando ANOVA, * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001. UA: unidades arbitrarias.

Participación de las vías de señalización Wnt en el control de la replicación de *T. cruzi*

Los macrófagos son células altamente plásticas que de acuerdo con los diferentes estímulos del microambiente pueden adquirir un importante rango de funciones, especialmente para modular la respuesta inmune innata mediante la secreción de factores solubles y productos de su metabolismo. Así, según el microambiente los macrófagos han sido en general clasificados como M1 o M2 en base a su correlación con las respuestas adaptativas polarizadas de tipo Th1 y Th2. Los macrófagos de tipo M1, también conocidos como “clásicamente activados” se generan en presencia de IFN- γ , TNF y/o LPS, exhiben potentes propiedades microbicidas basadas en la producción de ON y metabolitos reactivos del oxígeno, y promueven la respuesta de tipo Th1 mediante la producción de IL-12. Las citoquinas de tipo Th2 como IL-4, IL-13 e IL-10 inducen macrófagos de tipo M2, o anti-inflamatorios los cuales presentan propiedades reparadoras de tejido e inducen respuestas de tipo Th2. Teniendo en cuenta los estímulos del microambiente, los macrófagos M2 han sido subdivididos en tres subtipos. Los M2a conocidos como "alternativamente activados" se generan en presencia de IL-4 o IL-13, expresan altos niveles de la enzima Arginasa-1, bajos niveles de iNOS y promueven la replicación intracelular de algunos patógenos intracelulares como el *T. cruzi*. Los M2b inducidos por inmunocomplejos en combinación con IL-1 β o LPS y los M2c activados por IL-10, TGF- β o glucocorticoides, tienen propiedades tolerogénicas.⁴²

Durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi* los macrófagos pueden actuar como células “hospedadoras” para los parásitos y, a su vez, como células efectoras en la respuesta inmune antiparasitaria temprana. El control del *T. cruzi* durante las etapas tempranas de la infección es críticamente dependiente de la activación de los mecanismos efectores de la inmunidad innata y posterior activación de macrófagos por citoquinas. Macrófagos activados por citoquinas pro-inflamatorias pueden activar la enzima indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO) y/o la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) las cuales llevan a la producción de kinureninas y ON respectivamente, principales mecanismos efectores para la muerte de los amastigotes intracelulares.^{18,20,22,23}

Algunas funciones de las células presentadoras de antígeno, como las CDs y los macrófagos, son reguladas por ligandos Wnt y así la activación o inhibición de las

diferentes cascadas de señalización que las proteínas Wnt inician pueden modificar la respuesta inmune innata y adaptativa en diferentes enfermedades inflamatorias.⁷¹ La expresión de diferentes ligandos Wnt en el microambiente de diferentes patologías inflamatorias representa un aspecto complejo, pero su modulación terapéutica resulta prometedora para controlar las respuestas inmunes durante infecciones, injuria tisular y procesos de reparación.^{156,51} Sin embargo, ya que las vías de señalización Wnt son controladas por diversos genes, es necesario estudiar cada tipo celular en su dinámica espaciotemporal para comprender su rol en la inmunomodulación.

La señalización Wnt cumple funciones heterogéneas en Mo, las cuales parecen depender de la fase en que se encuentra la respuesta inflamatoria. Bajo condiciones fisiológicas homeostáticas Wnt5a es necesaria para prolongar la supervivencia y mantener la capacidad microbicida de macrófagos.⁷⁷ Algunos reportes indican que la expresión aberrante de ligandos Wnt, como Wnt5a en macrófagos, pueden estar asociados con la inflamación metabólica que ocurre en la sepsis, cáncer, obesidad y aterosclerosis tanto en humano como en ratón.¹⁵⁷ Además, se ha demostrado que durante diversas infecciones y en procesos inflamatorios se inducen componentes de las vías de señalización Wnt modulando el fenotipo de respuesta funcional específica (anti- o pro-inflamatorias) promovida por los macrófagos^{57,78,117,138} aunque por lo general, durante reacciones inflamatorias la activación de las vías Wnt en Mo y CD4 lleva al desarrollo de respuestas supresoras potencialmente capaces de prevenir la excesiva inflamación y contribuir a la homeostasis. En sumatoria, los estudios de las vías Wnt realizados en macrófagos indican que las proteínas Wnt en estas células juegan un rol importante en el daño y la reparación de tejidos, aunque no siempre del mismo modo. De acuerdo con estos hallazgos, no todos los ligandos Wnt muestran funciones biológicas similares y es de esperar entonces, que según el contexto infeccioso / inflamatorio, estas vías de señalización modulen las respuestas inmunológicas de una forma determinada que debe ser estudiada de forma puntual.

La inhibición de las vías de señalización Wnt limita la replicación intracelular de *Trypanosoma cruzi* en macrófagos.

Para evaluar cómo influye sobre la replicación intracelular de *T. cruzi* la acumulación de β -catenina y la secreción de proteínas Wnt en los macrófagos, se trataron BMM 24 h antes de la infección con activadores e inhibidores farmacológicos que poseen diferentes

mecanismos de acción sobre β -catenina (Tabla 2) y con IWP-L6, respectivamente. Luego de la infección se determinó el porcentaje de células infectadas y el número promedio de parásitos en el interior celular mediante inmunofluorescencia. La activación de los macrófagos con LPS (10 μ g/mL) e IFN- γ (10 ng/mL) se utilizó como control positivo de la activación de BMM hacia un perfil M1 capaz de controlar la replicación intracelular de parásitos.

Tabla 2. Activadores e inhibidores de β -catenina o de la secreción de proteínas Wnt, concentraciones y controles utilizados en los cultivos celulares.

Compuesto	Mecanismo de acción	Concentración	Control	Ref.
LiCl (Sigma Aldrich #62476)	Inhibidores de la actividad de la proteína GSK-3 β , lo cual induce acumulación de β -catenina en citoplasma y su translocación nuclear.	10 mM	PBS	158
BIO (TOCRIS #3194)		5 μ M	MeBio	159
iCRT14 (TOCRIS #4299)	Inhibidores de la interacción de β -catenina con los factores de transcripción LEF/TCF en el núcleo celular, lo cual induce la inhibición de la transcripción de genes dependientes de β -catenina	50 μ M	DMSO	160
CCT036477 (ENZO #114-0005)		20 μ M	DMSO	161
IWP-L6 (Millipore #504819)	Inhibidor de la O-acil-transferasa PORCN responsable de las modificaciones post-traduccionales de ligandos Wnt necesarias para su secreción. Su utilización inhibe la secreción de proteínas Wnt al medio extracelular.	20 μ M	DMSO	145

Los tratamientos con los estabilizadores de β -catenina, LiCl y BIO, no fueron capaces de modificar significativamente el crecimiento intracelular del parásito, mientras que, tanto el bloqueo de la transcripción de genes dependientes de β -catenina con iCRT14 y CCT036477, como la inhibición de la secreción de proteínas Wnt, resultó en la inhibición de la replicación intracelular del parásito (Fig. 24A y B). De manera interesante, la

inhibición de la replicación intracelular del parásito fue más significativa cuando se utilizaron estrategias de bloqueo de las vías Wnt que activando a los BMM con LPS e

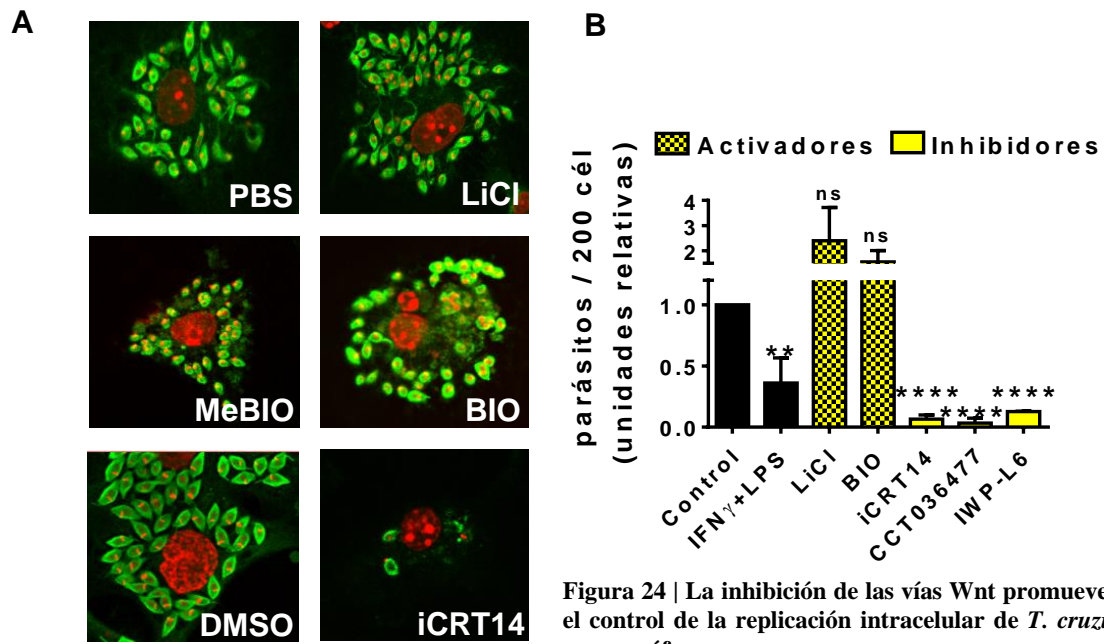


Figura 24 | La inhibición de las vías Wnt promueve el control de la replicación intracelular de *T. cruzi* en macrófagos.

BMM de ratones B6 fueron tratados por 24 h con vehículo (Control), activadores de β -catenina (LiCl o BIO), inhibidores de la transcripción de genes dependientes de β -catenina (iCRT14 y CCT036477), inhibidor de la secreción de proteínas Wnt (IWP-L6), LPS e IFN- γ o vehículo antes de ser infectados con Tps de *T. cruzi* (1:3). A las 72 h pi los parásitos intracelulares fueron contados por de inmunofluorescencia. **A)** Se muestra un campo representativo de cada grupo (2000X). PBS o DMSO fueron utilizados como vehículos para LiCl o para iCRT14, CCT036477 e IWP-L6 respectivamente. MeBIO fue utilizado como control del tratamiento con BIO. El control con LPS e IFN- γ se realizó utilizando como vehículo PBS (izquierda) ó DMSO (derecha).

B) El número de amastigotes intracelulares fue determinado por microscopía confocal. Las barras representan unidades relativas, calculadas como resultado del cociente entre el número de parásitos intracelulares luego de cada tratamiento (n/200 células) y el número de parásitos intracelulares en el cultivo control correspondiente (n/200 células). Las barras representan el promedio \pm SEM de cuatro experimentos independientes. La significancia fue calculada utilizando ANOVA, * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001.

IFN- γ , una combinación clásica para inducir macrófagos M1 con gran poder microbicida. Es importante destacar que debido a que se ha demostrado que IWP-L6 fue capaz de inhibir tanto la acumulación y translocación nuclear de β -catenina, como la activación de CAMKII y NFATc1 (Fig. 15A y B), la activación de ambas vías, canónica y dependiente de Ca⁺⁺ estarían promoviendo la replicación de *T. cruzi* en los macrófagos infectados. Similares resultados se observaron cuando los tratamientos con las drogas fueron

agregados a los cultivos al mismo tiempo en el que se realizó la infección (resultados no mostrados). Para descartar un efecto tóxico de estos compuestos sobre los BMM que podría modificar la replicación parasitaria por la pérdida de viabilidad de la célula huésped, se determinó la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de cultivo como un indicador de muerte celular. La Fig. 25 muestra que ninguno de los tratamientos realizados modifica la sobrevivencia celular.

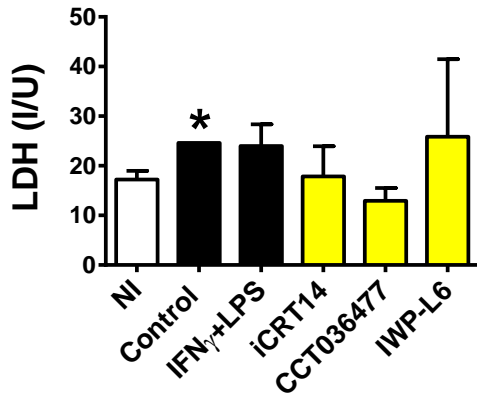


Figura 25 | Los tratamientos con inhibidores de las vías Wnt no inducen efectos tóxicos sobre los macrófagos infectados por *T. cruzi*.

BMM de ratones B6 fueron tratados por 24 h con vehículo (Control), activadores de β -catenina (LiCl o BIO), inhibidores de la transcripción de genes dependientes de β -catenina (iCRT14 y CCT036477), inhibidor de la secreción de proteínas Wnt (IWP-L6), LPS e IFN- γ o vehículo antes de ser infectados con Tps de *T. cruzi* (1:3). La concentración de LDH liberada al sobrenadante de cultivo fue determinada por análisis colorimétrico a las 24 hpi. Se muestran los resultados de un experimento representativo de cuatro experimentos independientes realizados. Se grafica la media \pm SEM. La significancia fue calculada utilizando ANOVA, * p <0.05.

De manera similar, tanto la inhibición de la transcripción de genes dependientes de β -catenina como la inhibición de la secreción de proteínas Wnt, resultó en la supresión de la replicación intracelular del parásito en macrófagos derivados de la línea celular de monocitos humanos THP-1 y en macrófagos de la línea celular J774 (línea de macrófagos derivados de ratones BALB/c) (Fig. 26).

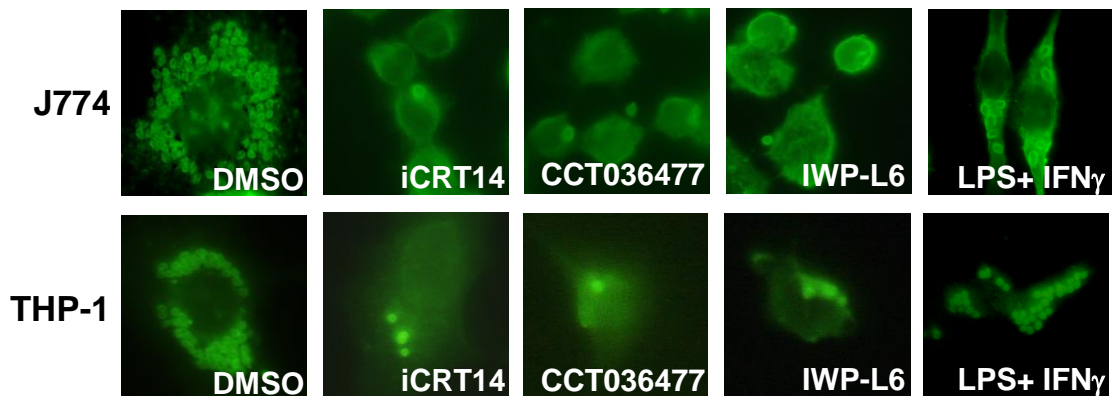


Figura 26 | La activación de las vías Wnt promueve el control de la replicación intracelular de *T. cruzi* en macrófagos.

Macrófagos de las líneas celulares J774 (BALB/c) o THP-1 (humanos) fueron tratados por 24 horas con inhibidores específicos de la transcripción de genes dependientes de β -catenina (iCRT14 y CCT036477), inhibidor de la secreción de proteínas Wnt (IWP-L6), LPS e IFN- γ o vehículo antes de ser infectados con Tps de *T. cruzi* por 24 h (1:3). Los parásitos intracelulares fueron contados por inmunofluorescencia a las 72 hpi. Se muestra un campo representativo de cada grupo (2000X).

Estos resultados permiten concluir que la activación de las vías Wnt canónica y Wnt/Ca⁺⁺ durante la infección de macrófagos con *T. cruzi* promueven la replicación intracelular del parásito. Así, la activación de estas vías en macrófagos podría proponerse como un mecanismo de evasión empleado por el parásito para establecerse en el hospedador.

La inhibición farmacológica de las vías Wnt induce macrófagos de tipo M1-like con potente actividad anti-*T. cruzi*.

Es claro que la inhibición de la activación de las vías Wnt, indujo en los macrófagos una fuerte capacidad microbicida capaz de controlar la replicación intracelular de *T. cruzi* de forma más eficiente que la de los clásicos macrófagos M1 generados por tratamiento con IFN- γ y LPS. A los fines de caracterizar fenotípicamente a este “nuevo subtipo” de macrófagos, se determinó comparativamente el perfil de citoquinas liberadas al sobrenadante de cultivo por BMM tratados con los diferentes compuestos, vehículo (control) o IFN- γ y LPS y luego infectados. La Fig. 27 muestra que 24 h pi los BMM que fueron tratados con los inhibidores de la transcripción de genes dependientes de β -catenina y de la secreción de proteínas Wnt, secretaron niveles significativamente mayores de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ , IL-12, IL-6 y TNF y niveles significativamente menores de la citoquina anti-inflamatoria TGF- β que los BMM tratados con vehículo. Respecto de la producción de IL-10, solo los BMM que fueron tratados con IWP-L6 fueron capaces de secretar niveles muy bajos, pero significativamente mayores a los secretados por BMM control (Fig. 27). La importante producción de citoquinas pro-inflamatorias se correlaciona con el control de la replicación del parásito observada en BMM tratados con iCRT14, CCT036477 o IWP-L6 (Fig. 24A y B). Es interesante notar que los BMM que fueron tratados con los inhibidores de las vías Wnt y que fueron más eficientes para controlar la replicación del *T. cruzi* que los clásicos macrófagos M1, secretaron a las 24 h pi niveles significativamente mayores de TNF, menores de TGF- β e IL-10 e indetectables niveles de IL-1 β (no mostrado) que los BMM tratados con IFN- γ y LPS (Fig. 27), sugiriendo un perfil de activación diferente al de los clásicos M1 que además producen IL-1 β .⁴¹ Respecto a la estabilización de β -catenina, a pesar que esta estrategia no incrementó significativamente la replicación del parásito, a las 24 h pi los BMM que fueron tratados con LiCl o con BIO secretaron mayores niveles de TGF- β , mientras que sólo los tratados con LiCl produjeron más IL-10 que los BMM control (Fig. 27).

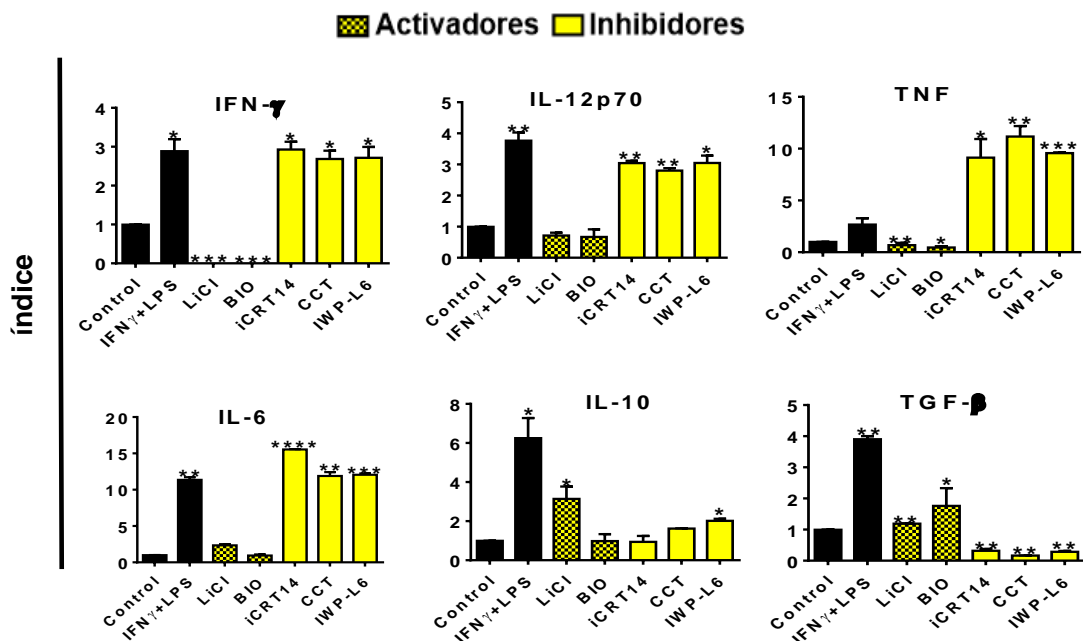


Figura 27 | La inhibición de las vías Wnt promueve la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos infectados con *T. cruzi*.

BMM fueron tratados por 24 h con vehículo (Control), activadores de β -catenina (LiCl o BIO), inhibidores de la transcripción de genes dependientes de β -catenina (iCRT14 y CCT036477), inhibidor de la secreción de proteínas Wnt (IWP-L6) o LPS e IFN- γ antes de ser infectados con Tps de *T. cruzi* (1:3). Luego de 24 h y se determinaron las concentraciones de diferentes citoquinas en el sobrenadante de cultivo por ELISA. Los resultados se representan como un índice obtenido del cociente entre la concentración de citoquinas liberadas por los BMM tratados con inhibidores y el nivel de citoquinas liberadas por los BMM cultivados con su correspondiente vehículo-control. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. La significancia fue calculada utilizando ANOVA, * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001.

Durante la infección con *T. cruzi*, las enzimas Arginasa-1, iNOS e IDO juegan un rol clave en el control de la replicación del parásito. La iNOS, por un lado, utiliza el aminoácido L-Arginina para producir cantidades de ON que es una molécula capaz de inducir la muerte directa de este parásito; y por el otro, compite con la enzima Arginasa-1 que lleva tras su activación a la producción de L-ornitina, citrulina y urea⁴⁶. El aumento en la actividad de Arginasa-1, inducida en macrófagos por diferentes componentes del *T. cruzi*, se relaciona con un perfil de activación alternativo anti-inflamatorio (M2) y se asocia a la promoción del crecimiento intracelular del parásito.^{45,46} Por otro lado, la activación de la enzima iNOS y la concomitante producción de ON, junto con la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (ROS), están relacionadas con un perfil de activación de macrófagos de tipo clásico inflamatorio (M1).

De manera interesante, mientras no se observaron diferencias en la producción de ON entre BMM tratados con los inhibidores y controles (Fig. 28A), los tratamientos con

CCT036477 e IWP-L6 disminuyeron significativamente la actividad de la enzima Arginasa-1 en BMM infectados respecto a BMM control (Fig. 28C). Respecto a la producción de cROS y mROS, relacionados a la capacidad microbicida y a la activación del inflammasoma y la producción de IL-1 β ¹⁶², los BMM tratados con IFN- γ y LPS son buenos productores de cROS y mROS, los BMM tratados con IWP-L6 produjeron niveles levemente incrementados de cROS y los BMM tratados con CCT036477 mostraron menor producción de mROS que los BMM control (Fig. 28B).

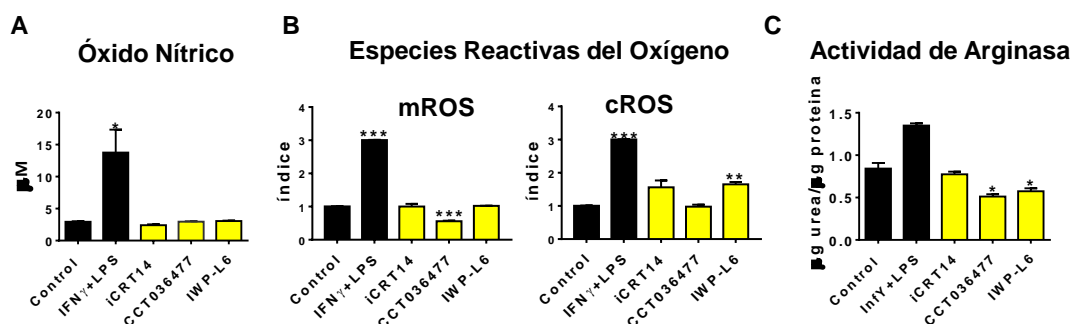


Figura 28 | Efecto de la inhibición de las vías Wnt sobre la actividad de iNOS y Arginasa y la producción de especies reactivas del oxígeno en macrófagos infectados con *T. cruzi*.

BMM de ratones B6 fueron tratados por 24 h con vehículo (Control), inhibidores de la transcripción de genes dependientes de β -catenina (iCRT14 y CCT036477), inhibidor de la secreción de proteínas Wnt (IWP-L6) o LPS e IFN- γ antes de ser infectados con Tps de *T. cruzi* (1:3). Luego de por 24 h se evaluó **A**) el nivel de nitritos en sobrenadante de cultivo mediante el test de Griess, **B**) las especies reactivas de oxígeno en mitocondrias (mROS) y citoplasma (cROS) por citometría de flujo utilizando sondas específicas y **C**) la actividad de la enzima arginasa en homogenatos celulares mediante test colorimétrico. Los resultados se representan como el índice obtenido del cociente entre el valor obtenido en los BMM tratados con inhibidores y el nivel obtenido en los BMM cultivados con su correspondiente vehículo-control. Las barras representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. La significancia fue calculada utilizando ANOVA, * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001.

IDO es otra de las enzimas clave que participan en el control de la replicación intracelular de *T. cruzi* mediante la estimulación de la producción de kinureninas que son tóxicas para el parásito. A los fines de completar la caracterización de los macrófagos tratados con los inhibidores de las vías Wnt, se estudió comparativamente la expresión y actividad de IDO en BMM tratados, controles y estimulados con IFN- γ y LPS a las 24 h pi. Tanto la inhibición de la transcripción de genes dependientes de β -catenina como la inhibición de la secreción de proteínas Wnt, fueron capaces de inducir a las 24 h pi un aumento en la expresión y actividad de IDO respecto a BMM control (Fig. 29A y B). De manera interesante, a pesar de que no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de IDO que presentaron los BMM tratados, se pudo observar un gradiente de

actividad de IDO: BMM IFN- γ y LPS > BMM IWP-L6 > BMM CCT036477 y iCRT14. Además, se demostró que los efectos inhibitorios del crecimiento intracelular del parásito que fueron inducidos por los tratamientos farmacológicos, se revirtieron parcialmente cuando se bloqueó la actividad de IDO con el inhibidor 1-MT (Fig. 29C), lo que indica que la activación de IDO sería uno de los mecanismos involucrados en el control de la replicación intracelular de *T. cruzi* en macrófagos tratados con inhibidores de las vías Wnt.

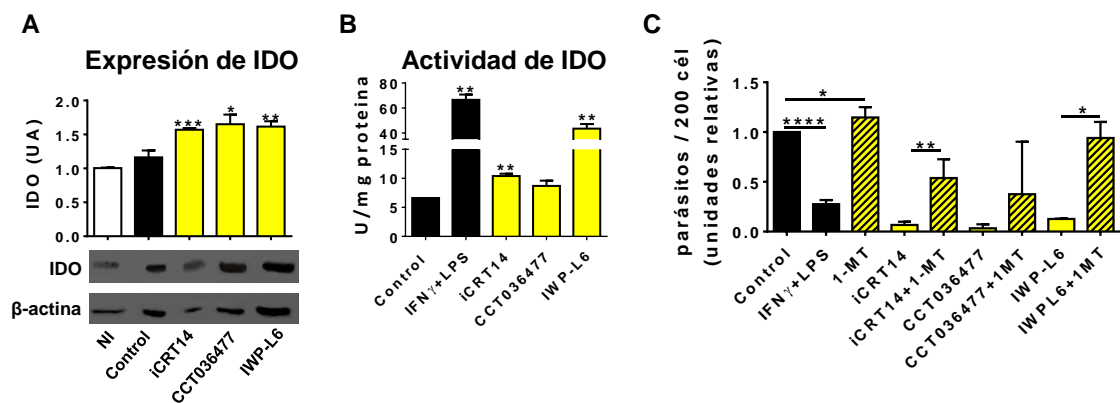


Figura 29 | Efecto de la inhibición de las vías Wnt sobre la actividad de IDO.

BMM fueron tratados por 24 h con vehículo (Control), inhibidores de la transcripción de genes dependientes de β -catenina (iCRT14 y CCT036477), inhibidor de la secreción de proteínas Wnt (IWP-L6), inhibidor de la actividad de IDO (1MT) o LPS e IFN- γ en presencia o ausencia de 1-MT antes de ser infectados con Tps de *T. cruzi* (1:3). **A)** Expresión de IDO por Western blot a las 24 hpi. Las barras muestran la expresión de IDO analizada por Western blot y normalizada respecto a la expresión de β -actina; **B)** Actividad de IDO luego de 24 hpi en homogenatos celulares mediante test colorimétricos. Los resultados se representan como el índice obtenido del cociente entre el valor obtenido en los BMM tratados con inhibidores y el valor obtenido en los BMM cultivados con su correspondiente vehículo-control; **C)** El número de amastigotes intracelulares contados por inmunofluorescencia y microscopía confocal 72 h pi en los BMM tratados como se indica al pie de la figura. Las barras representan unidades relativas, calculadas como el resultado del cociente entre el número de parásitos intracelulares luego de cada tratamiento (n/200 células) y el número de parásitos intracelulares en el cultivo control correspondiente (n/200 células). Las barras representan el promedio \pm SEM de cuatro experimentos independientes. La significancia fue calculada utilizando ANOVA, * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001; **** p <0.0001.

Tomados en conjunto, la producción de citoquinas y la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de la Arginina y el Triptófano luego de la infección, sugieren que la inhibición de la expresión de genes dependientes de β -catenina y la inhibición de la secreción de proteínas Wnt inducen subtipos de macrófagos que podrían denominarse M1-like por su semejanza con los clásicos macrófagos M1, pero que se diferencian de estos en poseer una mayor capacidad microbicida, secretar importantes niveles de

citoquinas IFN- γ , IL-12, TNF, IL-6, muy bajos niveles de TGF- β e IL-10, incrementar los niveles deIDO y disminuir la actividad de Arginasa-1 en ausencia de incremento en la actividad de iNOS, producción de ROS y secreción de IL-1 β .

La identificación de la expresión diferencial de genes entre condiciones específicas es la clave para comprender las variaciones fenotípicas y funcionales de determinados grupos celulares. Actualmente, se realiza la secuenciación de RNA (RNA-seq) utilizando técnicas de secuenciación de segunda generación (NGS), que engloba tecnologías que permiten la secuenciación masiva a gran escala de RNA para revelar la presencia y la cantidad de ARN en una muestra biológica en un momento dado.¹⁶³ Así, se realizó RNA-seq para estudiar las diferencias en la expresión de genes entre los diferentes grupos de BMM tratados e infectados, controles infectados sin tratamiento previo y BMM sin infectar. Volcando los resultados obtenidos del análisis de 919 grupos de genes en un gráfico de componentes principales (CP) en el cual el CP1 explica el 32% de la varianza y el CP2 el 9% de la varianza, se pueden distinguir claramente 5 grupos diferentes de macrófagos: BMM no infectados, BMM no tratados e infectados, BMM tratados con inhibidores de la transcripción de genes dependientes de β -catenina e infectados, BMM tratados con IWP-L6 e infectados y BMM estimulados con LPS e IFN- γ e infectados (M1). El análisis simple del gráfico y de los datos del análisis de enriquecimiento de genes (GSEA *report*) permitió corroborar algunos de los resultados obtenidos en la producción de citoquinas y la expresión de enzimas entre los diferentes tratamientos y los macrófagos estimulados con LPS e IFN- γ : **a)** la infección de BMM induce una gran modificación del transcriptoma ya que los grupos de BMM infectados se diferencian claramente de los no infectados (568/919 grupos de genes se encuentran regulados positivamente en BMM infectados vs 351/919 en los BMM sin infectar); **b)** el transcriptoma de los BMM tratados con los inhibidores de la transcripción de genes dependientes de β -catenina iCRT14 y CCT036477 es muy similar entre sí pero muy diferente a los BMM clásicos M1 y a los tratados con IWP-L6; **c)** los BMM tratados con el inhibidor de la secreción de proteínas Wnt (IWP-L6) exhiben un fenotipo intermedio entre los BMM infectados y los BMM M1 clásicos tratados con LPS e IFN- γ (Fig. 30).

En conjunto, estos resultados indican que tanto los macrófagos tratados con inhibidores de la transcripción de genes dependientes de β -catenina como los tratados con el inhibidor de la secreción de proteínas Wnt IWP-L6 podrían considerarse dos nuevos subtipos de macrófagos, diferentes de los clásicos M1, con una importante capacidad para controlar

la replicación intracelular del *T. cruzi*. En el laboratorio se están realizando los análisis del resto de datos obtenidos a partir de los RNA-seq a los fines de caracterizar transcricionalmente estos nuevos subtipos de macrófagos.

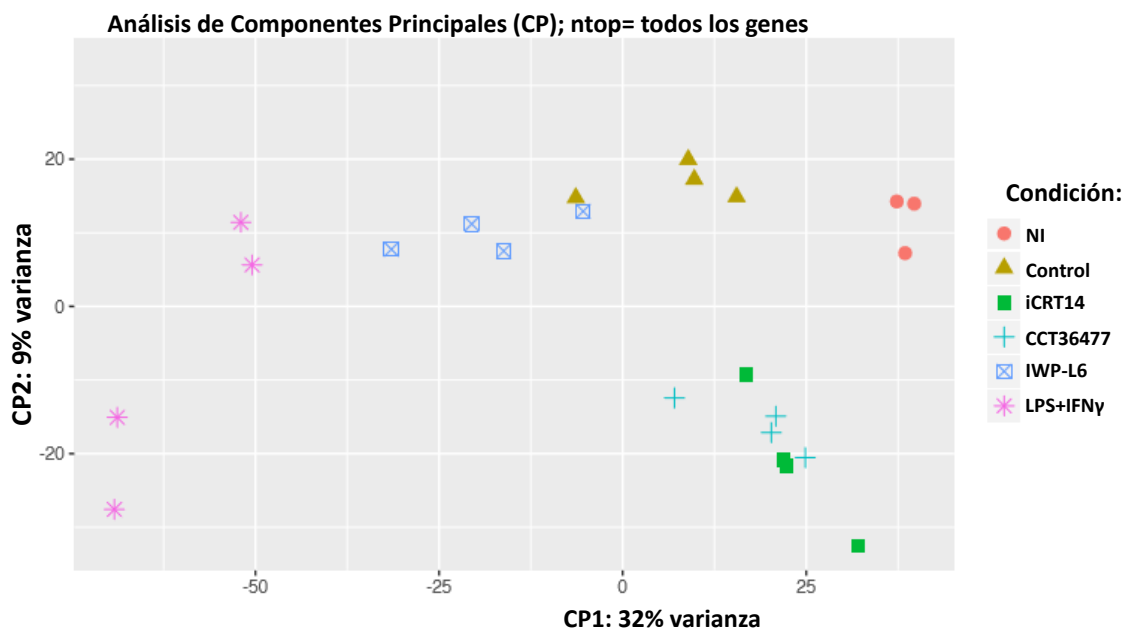


Figura 30 | La inhibición de las vías Wnt promueve un fenotipo M1-like en macrófagos infectados con *T. cruzi*.

BMM de ratones B6 fueron tratados con vehículo (Control), inhibidores de la transcripción de genes dependientes de β -catenina (iCRT14 y CCT036477), inhibidor de la secreción de proteínas Wnt (IWP-L6) o LPS e IFN- γ antes de ser infectados con Tps de *T. cruzi* (1:3) por 24 horas. Se muestra un análisis de Componentes Principales (CP) para el conjunto de datos obtenidos del transcriptoma completo (base de datos de 18.168 genes) obtenido mediante RNA-seq. Se muestran los resultados obtenidos en cuatro muestras por cada condición: BMM no infectados, BMM infectados, BMM tratados con iCRT e infectados, BMM tratados con CCT36477 e infectados, BMM tratados con IWP-L6 e infectados y BMM tratados con LPS e IFN- γ e infectados.

La inhibición *in vivo* de la señalización Wnt promueve la resistencia a la infección con *T. cruzi*.

A los fines de evaluar el efecto de la inhibición de la secreción de proteínas Wnt *in vivo* durante la infección con *T. cruzi* sobre la carga parasitaria, ratones B6 infectados con una dosis letal 50 (DL50) de Tps de *T. cruzi* fueron tratados con IWP-L6 en los días 5, 8, 11 y 14 pi siguiendo el esquema experimental descrito en Fig. 18; mientras que ratones tratados con vehículo fueron utilizados como control. Cabe destacar que, como se demostró anteriormente, el tratamiento con IWP-L6 fue capaz de inhibir tanto la vía Wnt / β -catenina como la vía Wnt / Ca⁺⁺ hasta por lo menos 18 días pi (Fig. 17). Ratones B6 infectados con *T. cruzi* e inyectados con vehículo (Control) presentaron altos niveles de

parasitemia y alrededor del 50 % de ellos murió entre los días 18 y 30 pi (Fig. 31A y B). En contraste, y aunque recibieron sólo cuatro dosis de IWP-L6, los ratones del grupo tratado presentaron significativamente menor parasitemia durante la etapa aguda de la infección y 100% de sobrevida (evaluada hasta el día 45 pi) (Fig. 31A y B).

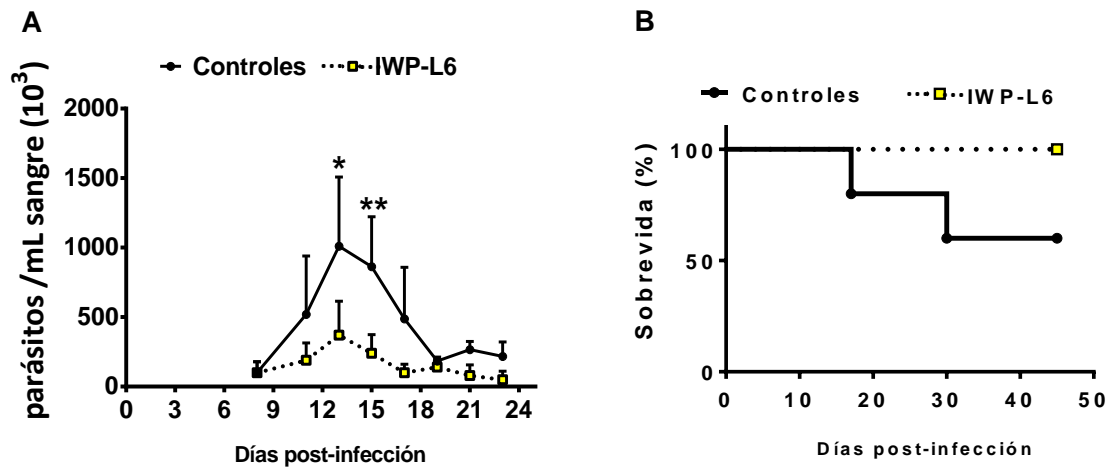


Figura 31 | La inhibición *in vivo* de la secreción de proteínas Wnt disminuye la parasitemia y mejora la sobrevida de ratones B6 infectados por *T. cruzi*.

Ratones B6 infectados con 100.000 Tps de *T. cruzi* fueron tratados con IWP-L6 o vehículo como se indica en la Figura 9. **A)** Carga parasitaria en sangre. **B)** Sobrevida. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados. Se grafica la media ± SEM de n=4 controles y n=6 tratados. La significancia fue calculada en A utilizando ANOVA y la sobrevida fue analizada empleando el test Kaplan-Meier, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Teniendo en consideración que el órgano blanco de la infección en esta cepa de ratones es el hígado, se evaluaron como indicadores de daño hepático los niveles plasmáticos de las transaminasas glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT) y glutamato-piruvato transaminasa (GPT) durante la etapa aguda de la infección. A los 18 días pi, los ratones tratados con IWP-L6 presentaron niveles plasmáticos significativamente menores de GOT y GPT que los ratones del grupo control. Además, los valores de GOT y GPT encontrados en el grupo tratado estuvieron dentro del rango de referencia de los valores de estas enzimas en plasma murino (Fig. 32).

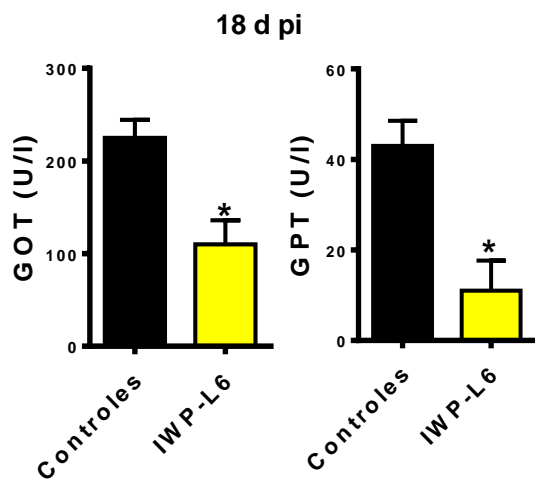


Figura 32 | La inhibición *in vivo* de la secreción de proteínas Wnt previene el daño hepático característico de la etapa aguda de la infección con *T. cruzi* en ratones B6.

Ratones B6 infectados con 100.000 Tps de *T. cruzi* fueron tratados con IWP-L6 o vehículo como se indica en la Figura 9. La concentración en suero de las enzimas marcadoras de daño hepático GOT y GPT fueron determinadas a los 18 días pi. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados. La barras indican la media ± SEM de n=4 animales control y n=6 animales tratados. La significancia fue calculada utilizando el test t de Student, * $p < 0.05$.

Para evaluar si el tratamiento administrado en la fase aguda de la infección es eficiente para controlar la carga parasitaria durante la etapa crónica, se comparó la carga parasitaria en los tejidos de los ratones sobrevivientes de ambos grupos a los 180 días pi. Los ratones tratados con IWP-L6 mostraron significativamente menor carga parasitaria en hígado y corazón que los ratones del grupo control durante la fase crónica de la enfermedad (Fig. 33).

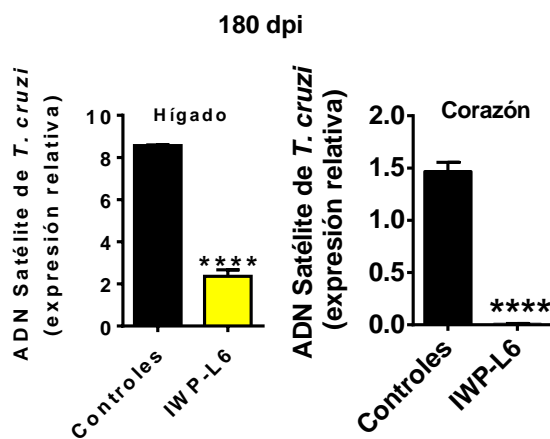


Figura 33 | La inhibición *in vivo* de la secreción de proteínas Wnt durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi* resulta en una menor carga parasitaria en hígado y corazón durante la etapa crónica.

Ratones B6 infectados con 100.000 Tps de *T. cruzi* fueron tratados con IWP-L6 o vehículo como se indica en la Figura 9. Expresión relativa de DNA satélite de *T. cruzi* en hígado y en corazón de ratones infectados luego de 180 días pi. GAPDH fue utilizado para la normalización. Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados. La barras indican la media ± SEM de n=4 animales control y n=6 animales tratados. La significancia fue calculada utilizando el test t de Student, **** $p < 0.0001$.

Estos resultados demuestran que el tratamiento con inhibidores de la secreción de proteínas Wnt, en solo 4 dosis durante la fase aguda de la infección con *T. cruzi*, prolonga la supervivencia, es efectivo para controlar la carga parasitaria en las fases aguda y crónica de la infección, y protege de la patología inflamatoria hepática en ratones B6.

Participación de la señalización Wnt en la modulación de la respuesta inmune protectora e inflamatoria durante la infección con *T. cruzi*

Teniendo en consideración que el tratamiento con IWP-L6 en ratones B6 fue capaz de disminuir significativamente la carga parasitaria durante la etapa aguda y crónica de la infección, modificar el perfil de los macrófagos hacia un subtipo M1-like y controlar la patología hepática, se consideró estudiar el efecto de este tratamiento en el modelo de infección crónica en ratones BALB/c a los fines de evaluar su eficacia en el control de la replicación parasitaria, su capacidad para modificar la respuesta inmune Th2 y prevenir el desarrollo de la patología cardíaca característica de esta cepa de ratones.

La inhibición *in vivo* de la señalización Wnt controla la parasitemia en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*.

Con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento con IWP-L6 en el control de la infección y la patología cardíaca inflamatoria, ratones BALB/c fueron infectados con una dosis no letal de *T. cruzi* para desarrollar un modelo de infección crónica que permita estudiar la fase crónica de la infección y la patología cardíaca. Posteriormente los animales fueron tratados con IWP-L6 o vehículo siguiendo el esquema de administración descrito en la Fig. 18. El tratamiento con IWP-L6, al igual que lo observado en ratones B6, fue capaz de disminuir significativamente la carga parasitaria en sangre de ratones BALB/c durante la fase aguda de la infección (Fig. 34).

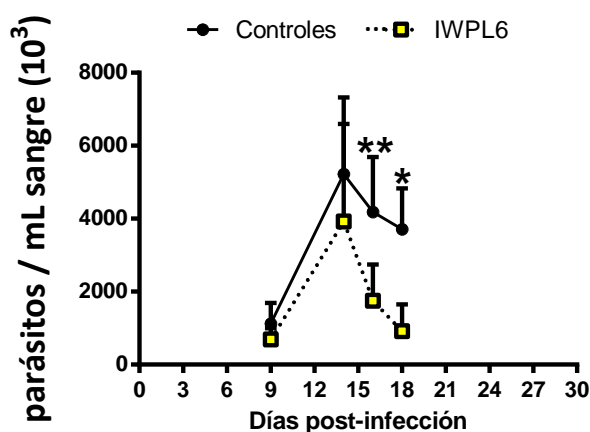


Figura 34 | La inhibición *in vivo* de la secreción de proteínas Wnt disminuye la parasitemia de ratones BALB/c infectados por *T. cruzi*.

Parasitemia en ratones BALB/c infectados con 1000 Tps de *T. cruzi* tratados con IWP-L6 o vehículo como se indica en la Figura 9. Se muestran resultados de un experimento representativo de tres realizados en forma independiente. Los datos se informan como la media \pm SEM de $n=5$ ratones control y $n=5$ ratones tratados. La significancia fue calculada utilizando ANOVA, * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

La inhibición *in vivo* de la señalización Wnt modifica el balance Th1/Th2 en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*

Como se mencionó previamente, a diferencia de los ratones B6 que desarrollan una respuesta Th1 y son resistentes a la infección con *T. cruzi*, los ratones BALB/c desarrollan una respuesta celular de tipo Th2 que es menos eficiente que la Th1 para controlar esta infección intracelular y expanden la población de células Treg que restringe el desarrollo de la respuesta protectora. Debido a que el tratamiento con IWP-L6 indujo en macrófagos de ratones B6 un perfil de activación de tipo M1-like que está asociado a una respuesta celular de tipo Th1, se hipotetizó que el tratamiento *in vivo* con este inhibidor podría modular la respuesta específica de los ratones BALB/c hacia un perfil Th1. A los fines de testear esta hipótesis en un primer experimento se analizó el compartimento de células esplénicas de bazo a los 18 días pi. No se observaron diferencias significativas en el número de esplenocitos totales, ni en el porcentaje y número de las sub-poblaciones de linfocitos T CD4+ (Fig. 35A y B).

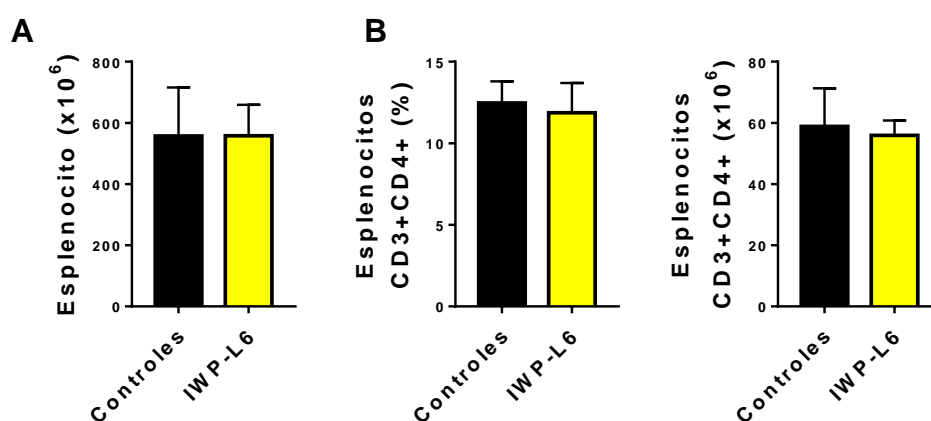


Figura 35 | Efecto del tratamiento con IWP-L6 en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* sobre las poblaciones de células T y macrófagos esplénicos.

Ratones BALB/c infectados con 1000 Tps de *T. cruzi* tratados con IWP-L6 o vehículo como se indica en la Figura 9. A los 18 días pi se determinó: **A)** el número de células mononucleares de bazo, **B)** el porcentaje (izquierda) y número total (derecha) de células CD3+CD4+ por citometría de flujo. Los datos se informan como la media \pm SEM de n=5 ratones control y n=5 ratones tratados. La significancia fue calculada utilizando el test t de Student.

Posteriormente, y para estudiar comparativamente el perfil de citoquinas producidas por la respuesta celular T específica contra *T. cruzi*, esplenocitos provenientes de ratones del grupo tratado y control fueron estimulados *in vitro* con un lisado de *T. cruzi* durante 4 h para evaluar el porcentaje de células productoras de citoquinas de tipo Th1 y Th2, y por

72 h para determinar el perfil de citoquinas secretadas al sobrenadante de cultivo. La Fig. 36 muestra que el porcentaje de células T CD4+ productoras de IL-4 (citoquina típica

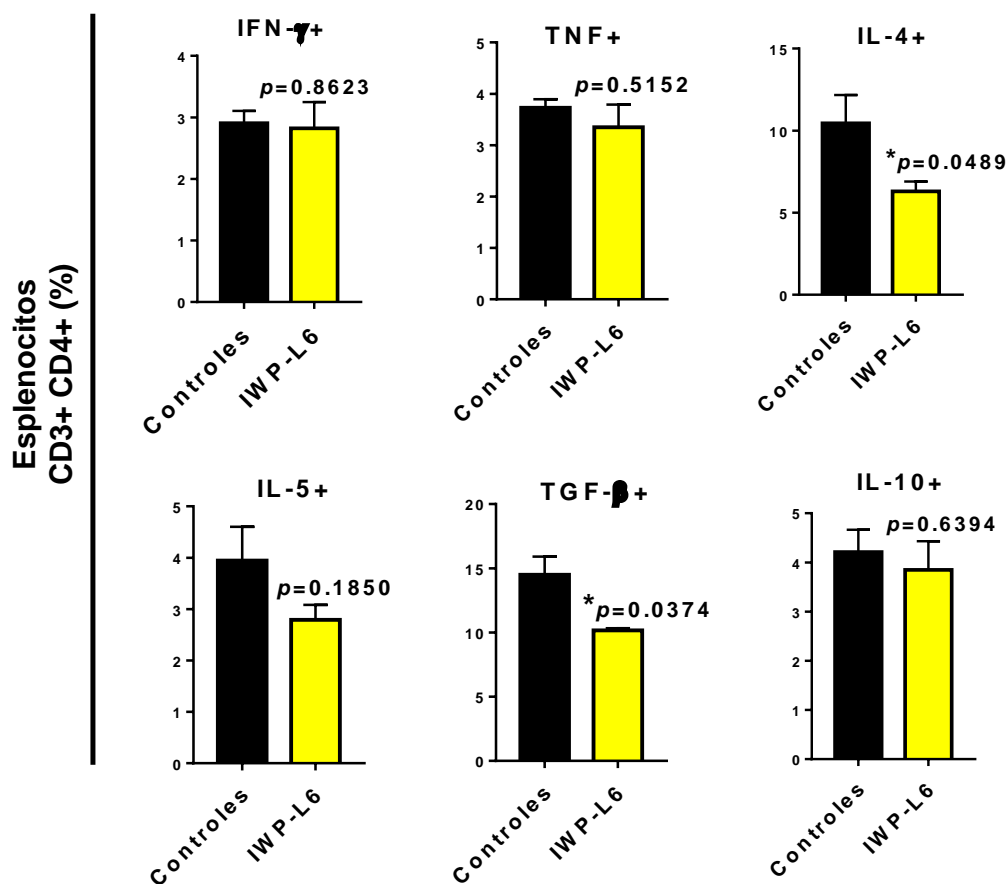


Figura 36 | Efecto del tratamiento con IWP-L6 en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* sobre las poblaciones de células T productoras de citoquinas.

Ratones BALB/c infectados con 1000 Tps de *T. cruzi* tratados con IWP-L6 o vehículo como se indica en la Figura 9. A los 18 días pi se obtuvieron las células mononucleares de bazo que fueron estimuladas en cultivo con antígenos de *T. cruzi*. Luego de 4 h se determinó por citometría de flujo el porcentaje de células CD3+CD4+ productoras de citoquinas clásicas de los perfiles Th1, Th2 y Treg. Las barras muestran la media \pm SEM de n=5 ratones/grupo. La significancia fue calculada utilizando el test *t* de Student, * p <0.05; ** p <0.01.

de la respuesta Th2) y de TGF- β (citoquina regulatoria) es significativamente menor en el bazo de los animales del grupo tratado con IWP-L6 respecto del grupo control, mientras que no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células T CD4+ productoras de IFN- γ , TNF, IL-10 e IL-5 entre los grupos. Estos resultados se correlacionan con los niveles de citoquinas secretadas al sobrenadante de cultivo que se muestra en la Fig. 37. Los esplenocitos de los ratones del grupo tratado secretaron, luego de la estimulación con antígenos del *T. cruzi*, mayores concentraciones de IL-2 e IL-12 (citoquinas de tipo Th1 y M1, respectivamente) y menores concentraciones de IL-4 que los esplenocitos del grupo control (Fig. 37).

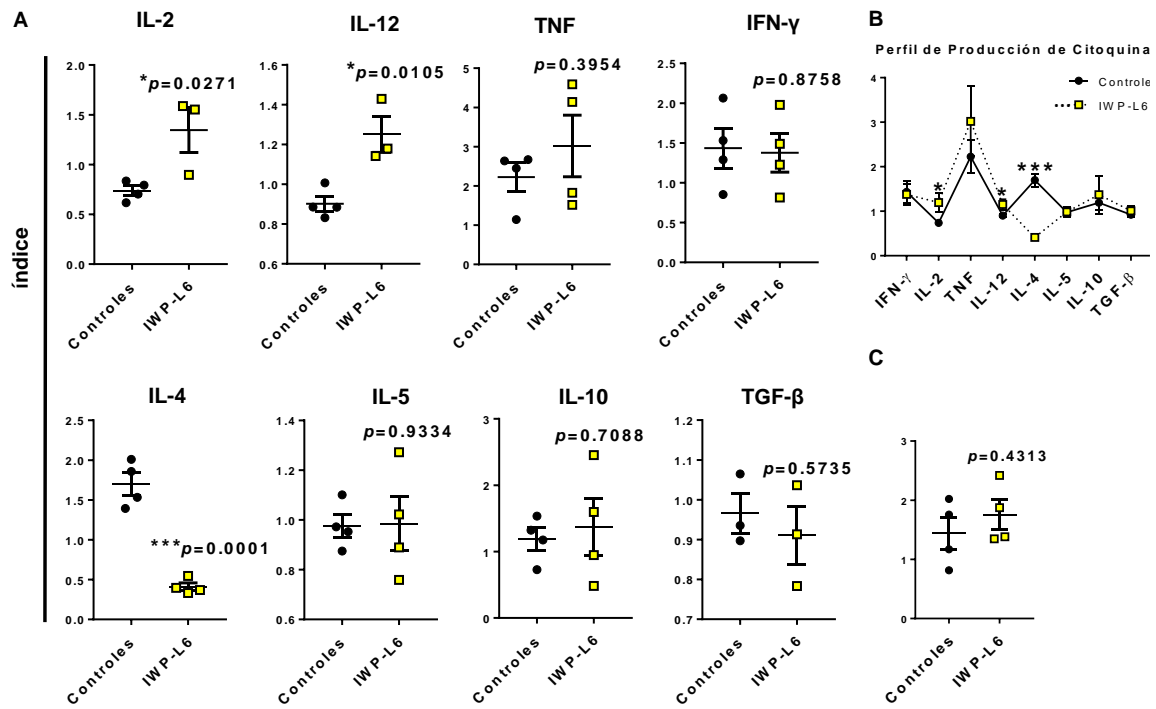


Figura 37 | Efecto del tratamiento con IWP-L6 en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* sobre la producción de citoquinas *in vitro*.

Ratones BALB/c infectados con 1000 Tps de *T. cruzi* tratados con IWP-L6 o vehículo como se indica en la Figura 9. A los 18 días pi se obtuvieron esplenocitos que fueron estimulados en cultivo con antígenos de *T. cruzi*. Luego de 72 h se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo. **A)** Concentración de las diferentes citoquinas como índice obtenido del cociente entre la concentración de citoquinas liberadas por los esplenocitos de cada ratón cultivados con antígenos de *T. cruzi* y la concentración de citoquinas liberadas por los esplenocitos del mismo animal cultivados con RPMI como control. **B)** Perfil de citoquinas secretadas al sobrenadante de cultivo en ratones tratados y controles. **C)** Concentración de óxido nítrico (ON) presente en los sobrenadantes determinados por el método de Griess. Se grafica la media del índice \pm SEM de $n=5$ ratones/grupo. La significancia fue calculada utilizando el test t de Student, * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

A pesar que los niveles de citoquinas de tipo Th1 como IFN- γ o TNF no mostraron diferencias entre los grupos, en conjunto los resultados indican que el tratamiento con IWP-L6 fue capaz de modificar, en los ratones BALB/c, el balance de citoquinas Th1/Th2.

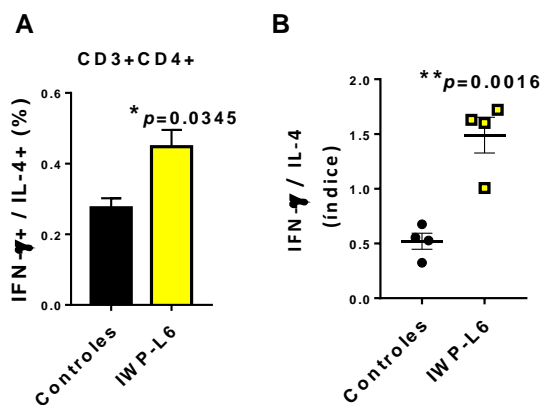


Figura 38 | La relación IFN- γ /IL-4 es mayor en ratones BALB/c infectados y tratados con IWP-L6 que en los controles.

Ratones BALB/c infectados con 1000 Tps de *T. cruzi* tratados con IWP-L6 o vehículo como se indica en la Figura 9. A los 18 días pi se obtuvieron las células mononucleares de bazo que fueron estimuladas en cultivo con antígenos de *T. cruzi*. **A)** Relación entre el porcentaje de células CD3+CD4+ productoras de IFN- γ y el porcentaje de células CD3+CD4+ productoras de IL-4 determinado por citometría de flujo como se indica en Figura 27. Las barras representan la media \pm SEM de $n=5$ ratones/ grupo. **B)** Relación entre los niveles de IFN- γ y los de IL-4 determinados en sobrenadantes de cultivo como se indicó en Figura 28. Cada punto representa la relación obtenida en un animal, $n=4$ ratones/grupo. La significancia fue calculada utilizando el test t de Student, * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

Ciertamente, en la Fig. 38 se muestra que la relación IFN- γ /IL-4, tanto en porcentaje de células productoras como en los niveles de estas citoquinas secretados al sobrenadante de cultivo, está significativamente aumentada en el grupo tratado con IWP-L6.

De manera similar, los ratones tratados con IWP-L6 presentaron mayores concentraciones séricas de IL-12 y TNF que los ratones control, indicando una modulación de la respuesta sistémica hacia el perfil Th1 (Fig. 39).

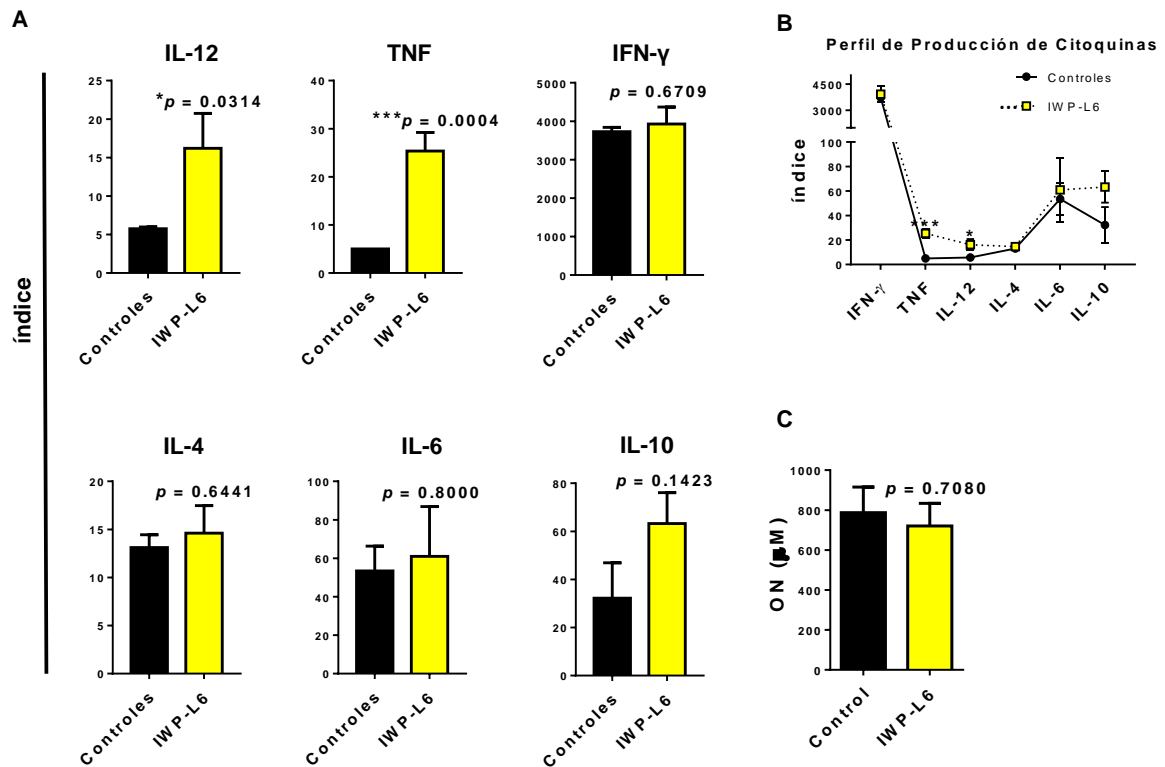


Figura 39 | Efecto del tratamiento con IWP-L6 en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* sobre el perfil de citoquinas en suero.

Ratones BALB/c infectados con 1000 Tps de *T. cruzi* tratados con IWP-L6 o vehículo como se indica en la Figura 9. A los 18 días pi se determinaron los niveles séricos de las diferentes citoquinas y de NO. **A)** Concentración de las diferentes citoquinas. **B)** Perfil de citoquinas en suero en ratones tratados y controles. **C)** Concentración de óxido nítrico (ON) presente en suero determinado por el método de Griess. Se grafica la media del índice \pm SEM de $n=5$ ratones/grupo. La significancia fue calculada utilizando el test *t* de Student, * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Posteriormente, a fines de evaluar el efecto del tratamiento con IWP-L6 en la respuesta de anticuerpos, se determinó el título de anticuerpos específicos contra *T. cruzi* del isotipo IgG2a, inducidos preferencialmente por células Th1 a través de IFN- γ y del isotipo IgG1¹⁶⁴, inducidos preferencialmente por células Th2 a través de IL-4.¹⁶⁴ La Fig. 40 muestra que, en concordancia con los menores niveles de IL-4 encontrados, los ratones tratados con IWP-L6 presentaron títulos de anticuerpos específicos de tipo IgG1 significativamente menores que los ratones control. Asimismo, y en concordancia con los

resultados obtenidos para IFN- γ (% de células productoras, citoquinas secretadas en el sobrenadante de cultivo y niveles sistémicos de esta citoquina), ambos grupos de ratones presentaron similares niveles de anticuerpos específicos del isotipo IgG2a (Fig. 40). En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con IWP-L6 aumenta el balance de respuesta Th1/Th2 a expensas de la disminución de la respuesta de tipo Th2, característica de ratones BALB/c cuando son infectados con *T. cruzi*.

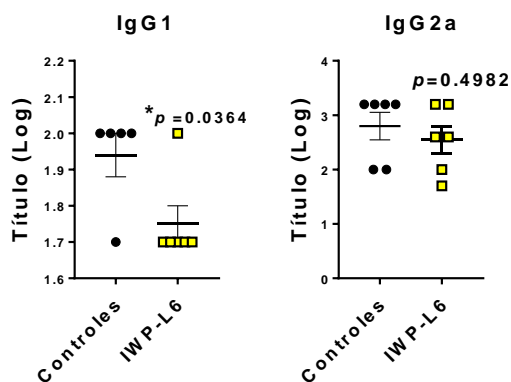


Figura 40 | Efecto del tratamiento con IWP-L6 en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* sobre el isotipo de IgG sérica específica contra el parásito. Ratones BALB/c infectados con 1000 Tps de *T. cruzi* tratados con IWP-L6 o vehículo como se indica en la Figura 9. A los 18 días pi se determinaron los títulos de IgG1 y IgG2a específicas contra antígenos de *T. cruzi* mediante ELISA. Se muestran se muestran como la media del Log del título de anticuerpos \pm SEM de n=6 ratones/grupo. La significancia fue calculada utilizando el test t de Student, * $p < 0.05$.

En la infección experimental con *T. cruzi* en ratones BALB/c la señalización Wnt incrementa la función supresora de las células Treg.

Las células Treg ejercen un rol crítico en el mantenimiento de la homeostasis y en el control de la respuesta inmune excesiva. Sin embargo, en algunas infecciones parasitarias un incremento en número o función de esta población va en detrimento de la respuesta inmune protectora. Por otra parte, los reportes bibliográficos indicando el rol de la señalización Wnt sobre la funcionalidad de células Treg es controvertido como se indicó en la introducción de esta tesis.

A los fines de evaluar el efecto de la inhibición de la secreción de proteínas Wnt sobre esta población celular se comparó el porcentaje, número absoluto y la funcionalidad de las células Treg esplénicas de ratones tratados con IWP-L6 y controles a los 18 días pi. La Fig. 41A muestra que ambos grupos de ratones presentaron valores similares en número y porcentaje de células Treg. Sin embargo, un ensayo típico de inhibición de la proliferación de células T efectoras que permite evaluar la funcionalidad de las células Treg evidenció que las células Treg purificadas de bazo de ratones tratados con IWP-L6 poseen menor capacidad para suprimir la proliferación de células T efectoras (CD4+ CD25-) que las células Treg purificadas de ratones control (Fig. 41B). En conjunto, estos resultados permiten concluir que el tratamiento con IWP-L6 es capaz de disminuir la

funcionalidad de las células Treg lo cual indica que en la infección de ratones BALB/c con este protozoario la señalización Wnt promueve la funcionalidad de las células Treg.

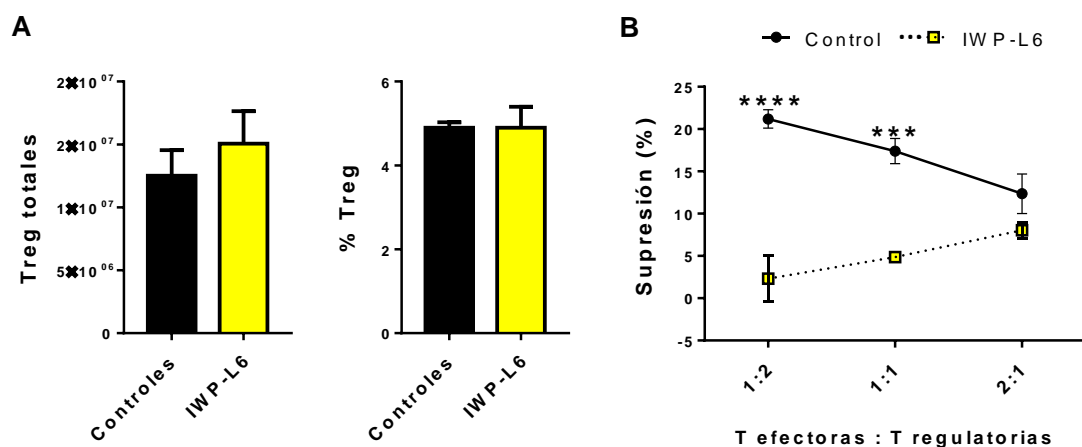


Figura 41 | La inhibición *in vivo* de la secreción de proteínas Wnt disminuye la funcionalidad de células Treg durante la etapa aguda de la infección en ratones BALB/c con *T. cruzi*.

Ratones BALB/c infectados con 1000 Tps de *T. cruzi* tratados con IWP-L6 o vehículo como se indica en la Figura 9. **A)** Número absoluto y porcentaje de células CD4+CD25+Foxp3+ esplénicas determinadas por citometría de flujo en el día 18 pi. **B)** Ensayo de supresión: células T CD4+CD25- (efectoras) purificadas de bazo de ratones BALB/c sin infectar y marcadas con CFSE fueron cultivadas con concentraciones crecientes de células CD4+CD25+ (Treg) esplénicas de ratones tratados y control en presencia de PMA y Ionomicina. La proliferación de las células efectoras fue evaluada mediante la dilución del CFSE luego de 96 h de cultivo. Se consideró 100% de proliferación, a la máxima dilución de CFSE en células efectoras estimuladas con PMA y Ionomicina y cultivadas en ausencia de células Treg. El % de supresión fue calculado como 100-% de proliferación de las células efectoras en cada co-cultivo. Se muestran los resultados de la media del % de supresión ± SEM de los valores obtenidos en un experimento representativo de dos realizados en forma independiente con n=4 ratones/grupo. La significancia fue calculada utilizando el test t de Student, **p*<0.05 ; ***p*<0.01; ****p*<0.001; *****p*<0.0001).

La inhibición farmacológica *in vivo* de la secreción de proteínas Wnt durante la fase aguda de la infección reduce la severidad de la CCC.

En los pacientes con CCC se producen diversas alteraciones cardiovasculares de carácter estructural y funcional como consecuencia de la lisis de las células miocárdicas infectadas que son sustituidas por tejido fibroso. A los fines de evaluar el efecto del tratamiento con IWP-L6 en la fase temprana del daño cardíaco, se determinaron los niveles séricos de las enzimas CPK y CPK-MB, indicadoras de daño miocárdico, la carga parasitaria y los niveles de ON en tejido cardíaco a los 18 días pi. La Fig. 42 muestra que los animales tratados con IWP-L6 vs los animales del grupo control presentaron niveles significativamente menores de ADN parasitario en tejido cardíaco asociados a un incremento en los niveles de ON, mientras que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de las enzimas cardíacas séricas entre los grupos.

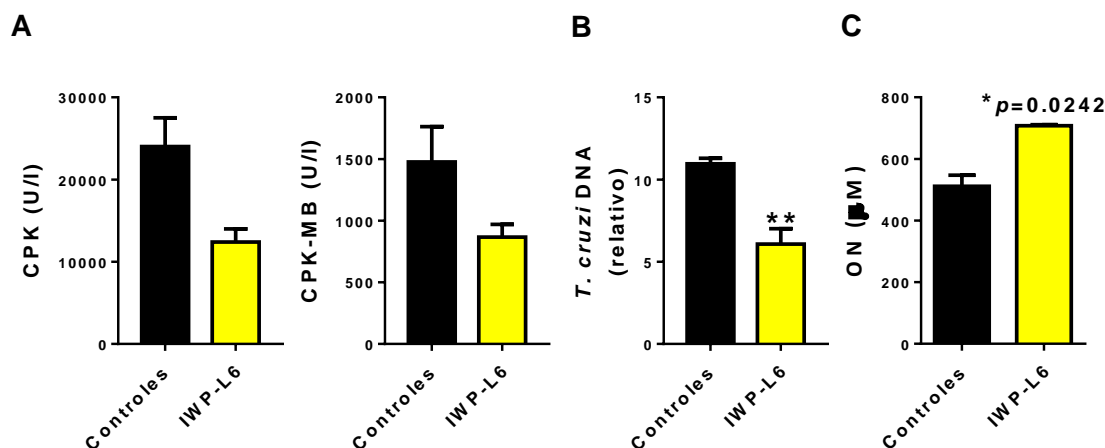


Figura 42 | La inhibición de la secreción de proteínas Wnt durante la etapa aguda de la infección con *T. cruzi* en ratones BALB/c disminuye los niveles séricos de marcadores de daño cardíaco y reduce la carga parasitaria en corazón.

Ratones BALB/c infectados con 1000 Tps de *T. cruzi* tratados con IWP-L6 o vehículo como se indica en la Figura 9. **A)** Niveles séricos de enzimas indicadoras de daño cardíaco a los 18 dpi. **B)** Expresión relativa de DNA satélite de *T. cruzi* en corazón de ratones infectados luego de 18 días pi. **C)** Niveles cardíacos de óxido nítrico (ON) fueron determinados mediante el método de Griess en lisados de corazones previamente perfundidos. Se muestran los resultados de la media \pm SEM de los valores obtenidos en un experimento representativo de tres realizados en forma independiente con n=4 ratones/grupo. La significancia fue calculada utilizando el test t de Student, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

La insuficiencia cardíaca izquierda aislada puede estar presente en las primeras etapas de la descompensación cardíaca de la CCC. Teniendo en cuenta la disminución de la carga parasitaria y la tendencia a normalizar los niveles de las enzimas marcadoras de daño cardíacas observadas en los animales tratados durante la etapa aguda de la infección, se estudió si el tratamiento con IWP-L6 sería capaz de modular el desarrollo de la CCC caracterizada por dilatación ventricular izquierda^{165,166}. Para ello, se evaluó durante la etapa crónica de la infección (180 días pi) la electrofisiología cardíaca y la función global del VI mediante ECG y ecocardiograma en dos dimensiones (2D-ECO), respectivamente. De manera interesante, además de controlar la replicación parasitaria, el tratamiento con 4 dosis de IWP-L6 en la fase aguda de la infección fue capaz de mejorar el funcionalismo cardíaco durante la fase crónica de la infección. Así, mientras los ratones infectados y tratados con vehículo mostraron una significativa prolongación de los segmentos QT y PR en el ECG, signo patognomónico de la infección por *T. cruzi* en ratones BALB/c¹⁶⁷, esta anomalía no se observó en los ratones tratados con IWP-L6, sugiriendo que el tratamiento puede prevenir el bloqueo de la conducción intraventricular (Fig. 43A). Complementariamente, el 2D-ECO reveló que el tratamiento con IWP-L6 disminuye el adelgazamiento (FAVI) a la vez que previene la disminución del volumen de eyección del VI (FEVI) (Fig. 43B), sugiriendo que la inhibición de la secreción de proteínas Wnt

durante la fase aguda de la infección previene el surgimiento de alteraciones de la función sistólica intraventricular durante la etapa crónica de la infección.

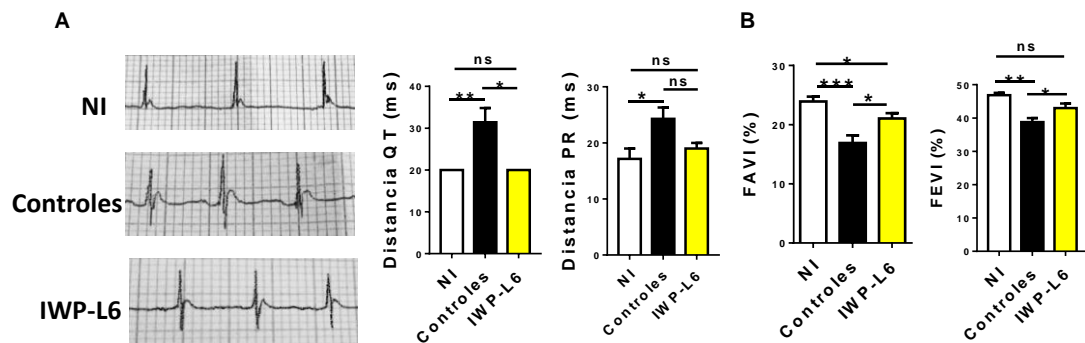


Figura 43 | La inhibición *in vivo* de la secreción de proteínas Wnt durante la etapa aguda de la infección con *T. cruzi* en ratones BALB/c previene la aparición de alteraciones cardíacas funcionales características de la fase crónica de la enfermedad.

Ratones BALB/c infectados con 1000 Tps de *T. cruzi* tratados con IWP-L6 o vehículo como se indica en la Figura 9. Luego de 180 días pi se realizaron las determinaciones de funcionalidad cardíaca. **A)** Segmentos QT y PR obtenidos por ECG. **B)** Fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo (FAVI) y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) obtenidos por 2D-ECO. Ratones sin infectar (NI) de la misma edad que los ratones de los grupos experimentales fueron utilizados como indicadores de los parámetros estudiados en condiciones normales. Se muestran los resultados de la media \pm SEM de n=8 ratones/grupo. La significancia fue calculada utilizando ANOVA, * p <0.05 ; ** p <0.01; *** p <0.001.

Estos hallazgos fueron consistentes con la evaluación de la histología cardíaca que reveló la presencia de frecuentes focos inflamatorios perivasculares y fibrosis en el corazón de ratones controles, que no fueron observados en los corazones de los ratones tratados con IWP-L6 que presentaron solo un infiltrado inflamatorio aislado (Fig. 44).

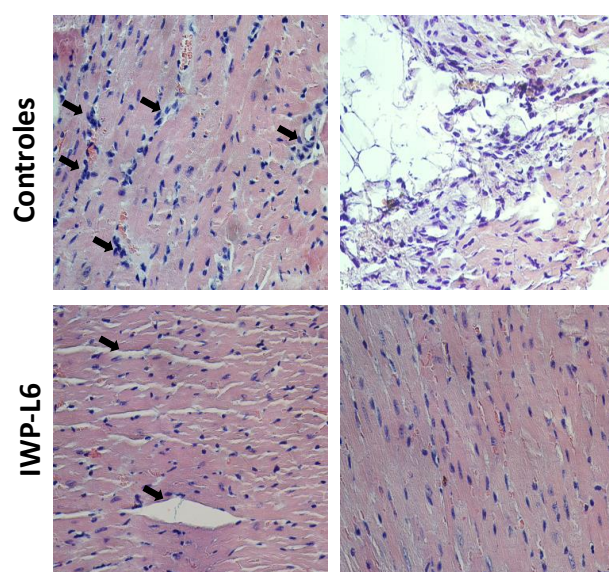


Figura 44 | La inhibición *in vivo* de la secreción de proteínas Wnt durante la etapa aguda de la infección con *T. cruzi* en ratones BALB/c previene la aparición del infiltrado inflamatorio y los focos de fibrosis característicos durante la etapa crónica de la infección.

Ratones BALB/c infectados con 1000 Tps de *T. cruzi* tratados con IWP-L6 o vehículo como se indica en la Figura 9. Luego de 180 días pi se realizaron cortes histológicos de corazón y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se muestra un campo representativo de n=7 ratones/grupo (1000X). Los paneles de la izquierda muestran infiltrado inflamatorio (flechas) y los de la derecha parénquima fibrosado.

Conclusiones

- ✓ La infección con *T. cruzi* induce la expresión de proteínas de la vía Wnt en esplenocitos de ratones infectados.
- ✓ La infección de macrófagos con *T. cruzi* modula la transcripción de genes y proteínas que codifican para los diferentes componentes de las vías de señalización Wnt.
- ✓ La infección con *T. cruzi* induce primero la activación de la vía Wnt / β -catenina y posteriormente de la vía Wnt / Ca^{++} en macrófagos.
- ✓ La señalización mediada por TLR2 y TLR4 es crucial para la acumulación de β -catenina en macrófagos infectados con *T. cruzi*.
- ✓ La inhibición de las vías de señalización Wnt limita la replicación intracelular de *T. cruzi* en macrófagos.
- ✓ La inhibición farmacológica de las vías Wnt induce macrófagos de tipo M1-like con potente actividad anti-*T. cruzi*.
- ✓ La inhibición *in vivo* de la señalización Wnt promueve la resistencia a la infección por *T. cruzi*.
- ✓ La inhibición *in vivo* de la señalización Wnt controla la parasitemia en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*.
- ✓ La inhibición *in vivo* de la señalización Wnt modifica el balance Th1/Th2 en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*.
- ✓ En la infección experimental con *T. cruzi* la inhibición farmacológica *in vivo* de la secreción de proteínas Wnt durante la fase aguda de la infección, reduce la severidad de la cardiopatía asociada a la enfermedad de Chagas.

Discusión

En la actualidad el tratamiento de la enfermedad de Chagas se centra en la eliminación del parásito y en el control de los síntomas. Existen dos fármacos disponibles en las regiones más afectadas para ser utilizadas durante el periodo agudo para la eliminación del parásito: Benznidazol y Nifurtimox.⁶ El principal problema con estas drogas es su alta toxicidad, y también su casi nula eficacia durante la etapa crónica de la infección. Esto, sumado a que aún no existe una vacuna contra *T. cruzi*, como así también a que hay una alta persistencia difícil de combatir del insecto vector en zonas endémicas, da lugar a la prevalencia de esta enfermedad en Latinoamérica desde hace tantos años.³

Dado que durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, los macrófagos actúan como células hospedadoras para el parásito y también como células efectoras en la respuesta inmune anti-parasitaria temprana, los estudios destinados a esclarecer las vías de señalización específicas que se activan en estas células durante la infección, son importantes a los fines de proponer tratamientos que promuevan una respuesta adecuada capaz de restringir la replicación de los parásitos e inducir una respuesta inmune adaptativa apropiada. Así, se podría colaborar en establecer nuevos posibles blancos terapéuticos.

Las vías Wnt son determinantes en procesos celulares críticos como el desarrollo, la homeostasis y la sobrevivencia. Sin embargo, hasta el comienzo de esta tesis, poco se conocía sobre la participación de la señalización dependiente de proteínas Wnt en células del sistema inmune. Se ha reportado que, en macrófagos, luego de la infección por *M. tuberculosis* y *M. bovis* incrementa β -catenina por un mecanismo mediado por TLR y NF- κ B.¹⁶⁸ En los últimos años, nuevos hallazgos han surgido sobre la participación de estas vías en la funcionalidad de células del sistema inmune y su participación en procesos inflamatorios e infecciosos. En esta tesis, se estudió por primera vez la participación de la vía Wnt/ β -catenina y Wnt/ Ca^{++} en macrófagos luego de la infección con un parásito protozoario intracelular, como es el *T. cruzi*, y se describen algunas consecuencias de su activación.

Se demostró que de manera temprana luego de la infección de macrófagos por *T. cruzi*, se induce la producción de ligandos Wnt (Wnt3a y Wnt5a) y la expresión de receptores Fzd capaces de interactuar con estas proteínas (Fzd4, Fzd6, Fzd8 y Fzd9). Además, se reveló que luego de este evento y durante el transcurso de la infección, se activan en macrófagos infectados primero la señalización dependiente de β -catenina y luego la de Ca^{++} . La activación de la señalización dependiente de β -catenina comienza a tiempos

cortos post-infección y se mantiene por tiempos prolongados, lo cual se evidencia por el incremento en la expresión de esta proteína y su translocación hacia el núcleo celular, en conjunto con el aumento en la transcripción de sus genes blanco *Axin1*, *Wisp1* y *Ccnd1* que se inducen al interactuar β -catenina con los factores de transcripción TCF / LEF. Por su parte la activación de la vía de Ca^{++} comienza a tiempos más tardíos post-infección, y se evidencia en el aumento de la forma activa de CAMKII (Thr286-CAMKII) en conjunto con la desfosforilación del factor de transcripción NFATc1 y su translocación hacia el núcleo celular.

Se ha demostrado que *T. cruzi* utiliza la señalización dependiente de Ca^{++} intracelular para estabilizar su ingreso a las células. Kayama *et.al*¹⁴³, han reportado que NFAT se activa en respuesta a *T. cruzi* de manera independiente de receptores TLR, pero las moléculas claves y las vías de señalización implicadas no han sido aún identificadas. Wnt3a y Wnt5a fueron durante años asociadas con la señalización Wnt/ β -catenina y Wnt/ Ca^{++} respectivamente. Sin embargo, actualmente se sabe que Wnt5a puede activar también la señalización dependiente de β -catenina, y que la actividad de ligandos Wnt y su unión a receptores Fzd dependen del contexto celular. De esta manera, las proteínas Wnt y los receptores Fzd ya no deberían ser rigurosamente subdivididos de acuerdo con la vía de señalización que inducen.⁵² Considerando que la infección de macrófagos por *T. cruzi* induce la activación de la señalización dependiente de β -catenina y de Ca^{++} , y que estos hallazgos se revierten al inhibir la secreción de proteínas Wnt con el inhibidor IWP-L6, estos resultados indican que tanto Wnt3a como Wnt5a, además de otros ligandos Wnt no estudiados en esta tesis, serían los responsables de la activación y mantenimiento de ambas vías, la vía Wnt/ β -catenina y la vía Wnt/ Ca^{++} .

Debido a que se ha reportado que la activación de la señalización dependiente de β -catenina puede darse en respuesta a señales dependientes de TLR, y teniendo en cuenta que TLR2, TLR4, TLR7 y TLR9 son los receptores de la inmunidad innata que participan del reconocimiento de antígenos de *T. cruzi*^{4,134}, se evaluó la participación de TLR2 y TLR4 en el aumento de la expresión de β -catenina. Se demostró que el reconocimiento del parásito por estos receptores es necesario para que se produzca la acumulación de β -catenina, ya que en macrófagos derivados de ratones deficientes en TLR2 ó TLR4 no se produce la acumulación de esta proteína como sí ocurre en macrófagos derivados de ratones WT. Debido a que la señalización por TLRs ha sido relacionada también con la activación de las vías PI3K/AKT y cAMP/PKA^{66,155} y teniendo en cuenta, que AKT y

PKA se activan luego de la infección por *T. cruzi*^{69,70,169,170} y que estas quinasas son capaces de fosforilar a β -catenina promoviendo su translocación hacia el núcleo^{146-148,171}; se evaluó el estado de fosforilación de β -catenina a tiempos cortos luego de la infección *in vitro*. β -catenina es fosforilada en mayor medida a tiempos cortos post-infección en Ser-552, mientras que es menos fosforilada en Ser-675. Ya que la fosforilación en Ser-552 es llevada a cabo tanto por AKT como por PKA, el aumento en Ser552- β -catenina puede ser efecto de la sumatoria de las fosforilaciones impartidas por ambas quinasas. Se demostró que, de la misma manera que en ausencia de TLR no incrementa la expresión total de β -catenina, tampoco se produce su fosforilación en Ser-552. De manera interesante, si bien ha sido demostrado que β -catenina puede ser activada por la señalización a través de TLR en ausencia de proteínas Wnt¹⁷², los resultados mostraron que la señalización por TLR2 y TLR4 es necesaria para la fosforilación temprana de β -catenina en Ser552 pero que esta fosforilación no se produce en ausencia de proteínas Wnt (tratamiento con IWP-L6). Es posible que en el modelo experimental empleado solo se pueda evidenciar el efecto de la señalización por TLRs/activación de AKT/PKA sobre la fosforilación de β -catenina cuando previamente ésta se acumule en citoplasma, lo cual es dependiente tanto de la señalización TLR como de la presencia de ligandos Wnt. En este sentido, el reconocimiento del parásito por TLR podría ser el evento primario que induce la secreción de proteínas Wnt que, por un lado, promueven la acumulación de β -catenina disponible para ser fosforilada tempranamente por AKT y PKA, y por otro, sostienen su translocación nuclear por tiempos prolongados. Cabe destacar que macrófagos provenientes de ratones deficientes en TLRs expresan basalmente β -catenina, pero no tienen la capacidad para acumular β -catenina luego de la infección.

Ya que algunos reportes indican que la producción de ligandos Wnt puede inducirse tras la interacción de ciertas citoquinas con sus receptores^{59,21, 26, 28, 30-37}, y que luego de la infección con *T. cruzi* los macrófagos se activan y secretan numerosas citoquinas, se determinó si la acumulación de β -catenina se relaciona con la señalización de las citoquinas IL-6, IL-10, IL-1 β , TNF, IFN-I e IFN- γ . Para ello se evaluó la acumulación de β -catenina luego de la infección con *T. cruzi* de macrófagos provenientes de ratones deficientes para la producción de IL-6 (IL6^{-/-}), IL-10 (IL10^{-/-}), IL-1 β (NLRP3^{-/-}) e IFN- γ (IFN γ ^{-/-}) o carentes de receptores para TNF (TNFRA^{-/-}) e IFN-I (IFNAR^{-/-}). Mientras macrófagos de ratones WT, IL-6^{-/-}, NLRP3^{-/-} y TNFRA^{-/-} incrementan alrededor de 2 veces la expresión de β -catenina a las 12 h pi, los provenientes de ratones IL-10^{-/-} lo hacen

cuatro veces. Se ha descrito que la activación de β -catenina en CDs induce la expresión de IL-10¹⁷³, sin embargo, el rol de la IL-10 secretada como un mecanismo para controlar la activación de β -catenina, como lo observado en estos experimentos, es un tema que no ha sido reportado.

Aunque la ausencia individual de una de estas citoquinas no es relevante para inhibir la acumulación de β -catenina, no se realizaron experimentos adicionales para recrear ausencias combinadas de 2 ó más citoquinas a la vez. De manera interesante, en ausencia de IFN- γ y del receptor para interferones tipo I, los macrófagos expresan en ausencia de infección, entre 5 y 6 veces más β -catenina que los macrófagos WT mientras que la acumulación de esta proteína no se modifica por la infección. Estos últimos resultados sugirieren un importante rol de la señalización fisiológica por receptores de interferones en la regulación negativa de la acumulación de β -catenina en macrófagos lo cual está de acuerdo con lo reportado recientemente en células tumorales.¹⁷⁴

En síntesis, en la primera parte de esta tesis se demuestra que luego de la infección por *T. cruzi*, los macrófagos producen proteínas Wnt y expresan receptores Fzd, que llevan primero a la activación de la vía Wnt/ β -catenina y luego Wnt/ Ca^{++} . Los receptores TLR que participan del reconocimiento de *T. cruzi*, son necesarios para que se produzca la acumulación de β -catenina. A tiempos cortos post-infección las quinasas AKT y PKA colaboran con la activación de β -catenina por fosforilación en Ser-552. De manera interesante, tanto para que β -catenina pueda ser fosforilada a tiempos cortos post-infección, como para mantener su acumulación y translocación nuclear por tiempos prolongados es necesario que se secreten proteínas Wnt. Además, mientras que la ausencia individual de IL-6, IL-1 β y TNF no altera la acumulación de β -catenina total post-infección, la señalización por interferones en estado basal y por la IL-10 en macrófagos infectados podrían estar involucradas en la regulación negativa de esta proteína. En este sentido, otros diseños experimentales, utilizando anticuerpos bloqueantes de estas citoquinas y otros mecanismos de activación de β -catenina en macrófagos, están siendo llevados a cabo en el laboratorio para estudiar si es este un mecanismo general o específico de esta infección.

La resistencia a la infección por *T. cruzi* ha sido asociada con la capacidad de las células NK y linfocitos T para generar IFN- γ ¹⁷⁵, el cual puede activar macrófagos para matar a los amastigotes intracelulares. La actividad tripanocida de macrófagos activados por citoquinas pro-inflamatorias es mediada por el aumento de la actividad de las enzimas

iNOS e IDO^{18-20,22,23}, las cuales participan en la producción de ON y kinureninas, respectivamente. Por otra parte, la susceptibilidad en esta infección está asociada a la producción de las citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β .¹⁷⁶⁻¹⁸⁰

En esta tesis se demostró que la activación de las vías Wnt promueve la replicación intracelular de *T. cruzi* en macrófagos. Si bien el tratamiento de macrófagos con los inhibidores de GSK-3 β (BIO o LiCl) que estabilizan β -catenina, no incrementó significativamente la replicación intracelular del parásito; el tratamiento de estas células con inhibidores específicos de la actividad transcripcional dependiente de β -catenina (iCRT14 y CCT036477) o IWP-L6 inhibe significativamente la replicación intracelular del parásito. Se ha demostrado que *Leishmania donovani*, otro protozooario intracelular activa la señalización de β -catenina inducida por AKT en macrófagos para inhibir la apoptosis celular y mantener un nicho donde replicarse.⁵⁶ Sin embargo, en el modelo experimental utilizado en este trabajo de tesis, ninguno de los inhibidores de β -catenina utilizados indujeron la muerte de los macrófagos infectados

Respecto a los mecanismos involucrados en el control de la replicación intracelular del parásito inducido por los inhibidores, se demostró que, luego del tratamiento con iCRT14, CCT036477 ó IWP-L6, los macrófagos incrementan la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ , IL-12, TNF e IL-6, mientras disminuyen la producción de la citoquina anti-inflamatoria TGF- β que está asociada a la susceptibilidad a la infección. Estos resultados concuerdan con reportes previos que demuestran que la activación de la vía canónica en macrófagos y CDs controla la respuesta inflamatoria y promueve un perfil tolerogénico.⁷⁴ Además, el tratamiento de macrófagos infectados con los inhibidores de las vías Wnt (CCT036477 e IWP-L6), induce disminución en la actividad de la enzima Arginasa-1, que como ya se ha descripto anteriormente por un lado induce la generación de metabolitos que promueven la replicación intracelular del parásito^{45,46,47}, y por el otro contrarresta la actividad de la enzima iNOS mediante la competencia por el sustrato L-Arginina.^{24,45} Sin embargo, los macrófagos infectados no mostraron incremento en la actividad de la enzima iNOS luego de los tratamientos. De manera interesante, y a pesar que se ha demostrado que β -catenina participa en la inducción de la actividad de la enzima IDO, y viceversa^{73,181}, en el modelo experimental utilizado en esta tesis, la inhibición de la transcripción de genes dependientes de β -catenina y la inhibición de la secreción de proteínas Wnt aumentó la expresión y la actividad de IDO. Se demostró que este incremento en la actividad de IDO es crítico para el control de la replicación de *T. cruzi*,

ya que al acompañar a los inhibidores Wnt con el inhibidor de la actividad de IDO (1-MT) se restaura casi totalmente la replicación intracelular del parásito. Reportes previos han demostrado que la expresión de IDO y la activación de β -catenina en macrófagos y CDs bajo condiciones tolerogénicas son mecanismos particularmente importantes que limitan la inflamación en mucosas y en el microambiente tumoral.^{74,182} Sin embargo, la expresión del gen de IDO no es solamente inducida en condiciones tolerogénicas sino también por interferones y TNF durante condiciones inflamatorias.¹⁸⁴ Teniendo en cuenta que luego de la infección de macrófagos con *T. cruzi* en presencia de inhibidores de β -catenina o de proteínas Wnt los macrófagos producen mayor cantidad de citoquinas pro-inflamatorias, es posible que el aumento en la expresión y actividad de IDO esté relacionado con la inducción de esta enzima por las citoquinas pro-inflamatorias.

En síntesis, los resultados obtenidos en esta parte demuestran que la actividad anti-*T. cruzi* de los macrófagos tratados con inhibidores de la señalización dependiente de β -catenina o de la secreción de proteínas Wnt, se debe a que estos tratamientos promueven un aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias que son capaces de inducir la actividad de moléculas antimicrobianas, dentro de las cuales IDO sería una de las más importantes.

Es interesante destacar que, a pesar de que los tratamientos con los inhibidores Wnt disparan la producción de citoquinas pro-inflamatorias clásicas del perfil de macrófagos M1 (IL-12, TNF e IFN- γ), no promueven la activación de la enzima iNOS ni la activación del inflammasoma y la producción de IL-1 β . Sumado a esto, el perfil de expresión génica evaluado mediante secuenciación del transcriptoma de macrófagos infectados y tratados con inhibidores Wnt, muestra que los macrófagos luego de estos tratamientos poseen un fenotipo intermedio entre el de macrófagos sin infectar y el de macrófagos clásicos M1 (macrófagos infectados con *T. cruzi* previamente activados con LPS e IFN- γ). En conjunto estos hallazgos demuestran que los macrófagos tratados con estos fármacos poseen un perfil de activación M1-like⁴³ que promueve el control de la replicación intracelular de *T. cruzi*. Análisis en profundidad de los transcriptomas permitirán caracterizar este nuevo subtipo de macrófagos y posiblemente identificar nuevos compuestos antimicrobianos.

Debido a que los resultados obtenidos *in vitro* demostraron que la infección por *T. cruzi* es capaz de activar las vías de señalización Wnt y que su inhibición controla la replicación intracelular del parásito en macrófagos, que promueve en los macrófagos un fenotipo M1-

like con mayor capacidad de producir citoquinas pro-inflamatorias, la última parte de este trabajo de tesis fue evaluar la relevancia clínica de la inhibición de las vías de señalización Wnt *in vivo*. Para ello se emplearon dos modelos experimentales en los que se pudo evidenciar las consecuencias de este tratamiento en la respuesta inflamatoria en hígado utilizando ratones B6, y en la modulación de la respuesta inmune de tipo Th2 y la evolución del daño cardíaco en el modelo de infección en ratones BALB/c.

Luego de la infección con *T. cruzi* los ratones B6 muestran una gran expansión de la población de células Th1 que favorece el control de la replicación del parásito, pero genera una respuesta inflamatoria tan fuerte que conduce a su muerte como consecuencia de la falla hepática por la inflamación no controlada.¹¹ El tratamiento de ratones B6 infectados con una dosis letal 50 (DL50) con el inhibidor de la secreción de proteínas Wnt (IWP-L6) resultó en reducción de la parasitemia y aumento de la supervivencia respecto de los controles. Además, durante la etapa aguda de la infección este tratamiento protegió a los ratones del daño hepático inducido por la respuesta inflamatoria. Durante la etapa crónica de la infección, los ratones del grupo tratado presentaron menor carga parasitaria en hígado y corazón que los ratones del grupo control. En conjunto, estos hallazgos demostraron que la inhibición de la secreción de proteínas Wnt no solo controla la replicación del parásito, sino que también regula la respuesta inflamatoria.

La infección de ratones BALB/c con *T. cruzi* induce un fenotipo de respuesta específica de tipo Th2. Además, en esta cepa de ratones, a diferencia de lo observado en los ratones B6, se expande la población de células Treg, estando este hecho posiblemente relacionado con la incapacidad de montar una respuesta inmune efectiva para controlar la infección.¹¹ Además, esta cepa de ratones presenta como órgano blanco de la infección al corazón y la muerte sobreviene como consecuencia de la gran carga parasitaria en combinación con el desarrollo de falla cardíaca. En esta tesis se evaluó el rol de la inhibición de la secreción de proteínas Wnt durante la infección con *T. cruzi* en ratones BALB/c infectados con una dosis de parásitos que les permite sobrepasar la fase aguda de la infección y desarrollar la fase crónica y la cardiomiopatía. El tratamiento con IWP-L6 en ratones BALB/c infectados incrementó la respuesta pro-inflamatoria sistémica lo cual se vio reflejado en los incrementados niveles de TNF e IL-12 en suero y con el aumento en los niveles de ON en corazón durante la etapa aguda de la infección, que son eventos que pueden relacionarse directamente con el control de infección. Teniendo en cuenta que TNF e IL-12 son citoquinas producidas por macrófagos de tipo M1⁴³, y que no se observaron

mayores concentraciones de ON en ratones tratados a nivel sistémico, estos resultados sugieren que al igual que lo observado en el modelo experimental en ratones B6, el inhibidor de la secreción de proteínas Wnt promueve la activación de los macrófagos hacia un perfil M1-*like* diferente del M1 clásico ya que no modifica la actividad de iNOS. Si esto fuese así, el tratamiento con IWP-L6 debería ser capaz de modular la respuesta de tipo Th2 característica de los ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*.

Para evaluar el efecto del tratamiento con IWP-L6 sobre la respuesta Th2 de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*, se estudió primero las citoquinas secretadas por células CD3+CD4+ de bazo luego de ser estimuladas con antígenos del parásito. Se observó que los ratones infectados y tratados con IWP-L6 presentan menor porcentaje de células específicas productoras de la citoquina IL-4 (característica de las células Th2), mientras que no mostraron cambios en el porcentaje de células productoras de citoquinas asociadas al perfil Th1. Resultados similares fueron observados cuando se evaluaron las citoquinas secretadas al sobrenadante de cultivo de células de bazo estimuladas con antígenos del parásito. En concordancia con estos resultados, la respuesta humoral observada en ratones tratados mostró menores títulos de anticuerpos específicos del isotipo IgG2 (característico de la respuesta Th2) que los ratones control mientras que los títulos de anticuerpos del isotipo IgG2a (característicos de respuestas de tipo Th1) no mostraron diferencias significativas entre los grupos. En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento es capaz de reducir la respuesta específica de tipo Th2 característica de los ratones BALB/c sin modificaciones importantes en la respuesta de tipo Th1, pero modificando significativamente el balance Th1/Th2 y favoreciendo así una respuesta protectora contra la infección. En conjunto, los resultados encontrados están de acuerdo con los reportes que indican que la activación de las vías Wnt promueven la diferenciación de las células T hacia un fenotipo Th2 ya que se ha demostrado que la expresión temprana del factor de transcripción GATA-3, requerida para la diferenciación de células CD3+CD4+ hacia el perfil Th2, es inducida por la interacción β -catenina/TCF-1.⁹¹

Por otro lado, también se describió el efecto del tratamiento con IWP-L6 en la población de células Treg y se estudió el porcentaje de células T CD4+ productoras de TGF- β . A pesar de no observarse diferencias significativas en el número y porcentaje de células Treg CD4+ CD25+ Foxp3+ entre ratones tratados y control, el tratamiento con IWP-L6 disminuyó la capacidad de células Treg para suprimir la proliferación de células T efectoras. Entre los mecanismos utilizados por las células Treg para ejercer su función

supresora sobre células T CD4+ se encuentra la capacidad de producir la citoquina supresora TGF- β .¹⁸⁵ En concordancia con esto, los ratones infectados y tratados con IWP-L6 mostraron menores porcentajes de células T CD4+ de bazo productoras de TGF- β que los ratones control. El hecho de que la función de las células Treg sea menor en los animales tratados es seguramente importante para condicionar el incremento de la respuesta sistémica de tipo Th1 (IL-12 incrementada en suero de ratones tratados vs controles). Así, se ha demostrado que la restricción en la diferenciación a células Treg que ocurre en las fases iniciales de infecciones con *T. cruzi*²⁹ y *T. gondii*¹⁸⁶ permiten el desarrollo de la respuesta Th1 protectora. Respecto a la función de la señalización Wnt directamente sobre células Treg, existe información controversial sobre el rol de las proteínas Wnt en la funcionalidad de estas células. Por un lado se ha reportado que en condiciones inflamatorias las proteínas Wnt pueden señalar en receptores Fzd presentes en células Treg e inhibir su función perpetuando de esa manera la inflamación.¹⁸⁷ En coherencia con estos resultados, también se ha reportado que la inhibición de la vía Wnt / β -catenina *in vivo* en un modelo de fibrosis pulmonar bloquea tanto la capacidad regulatoria de Tregs como la polarización hacia un perfil Th2.¹⁸⁸ Sin embargo, otros reportes demuestran que la activación de la vía Wnt/ β -catenina en CD4+ o directamente en Treg incrementa la función supresora de las células Treg.^{140,141} De esta manera, en el modelo experimental estudiado en esta tesis, durante el tratamiento con IWP-L6, la disminución en la respuesta Th2 y la deficiencia en la función supresora de las células Treg, junto con la activación de tipo M1-like en los macrófagos colaborarían en el mismo sentido a mantener el circuito de respuesta M1-Th1-M1 que en la infección con *T. cruzi* contribuye al control de la carga parasitaria.

Es bien aceptado que tanto la persistencia crónica del parásito como la excesiva respuesta inflamatoria generada por la infección participan en el desarrollo de la patología cardíaca asociada a la enfermedad de Chagas crónica. Estudios recientes en humanos han demostrado que la aparición combinada de áreas focales de inflamación, necrosis y fibrosis del miocardio resulta en la aparición de las anomalías características en la función del VI.¹⁶⁵ En esta tesis se demostró que el tratamiento con IWP-L6, disminuye la carga parasitaria en el tejido cardíaco durante la etapa aguda de la infección, y que durante la etapa crónica los ratones tratados con IWP-L6 presentan menor infiltrado inflamatorio y fibrosis del parénquima cardíaco que los ratones control. De manera interesante, estos hallazgos se relacionan directamente con los resultados de las pruebas funcionales, ECG

y 2D-ECO, que mostraron que el tratamiento con IWP-L6 disminuye el bloqueo cardíaco a la vez que previene el adelgazamiento del VI y conserva su capacidad eyectora. Estos datos son interesantes porque demuestran que el tratamiento con IWP-L6 preserva la función sistólica del VI, lo cual impide la falla cardíaca.

Numerosos estudios han demostrado que la señalización Wnt/ β -catenina es suficiente y necesaria para la inducción de fibrosis, lo cual establece a la señalización Wnt canónica como una vía pro-fibrótica central que participa del desarrollo de múltiples enfermedades que cursan con fibrosis en piel, pulmón, riñón, hígado, corazón y músculo.¹⁸⁹⁻¹⁹⁴ Por ejemplo, se ha demostrado que el aumento de la señalización de Wnt/ β -catenina en la enfermedad renal crónica promueve el desarrollo de fibrosis mediante la inducción de macrófagos alternativamente activados (M2) y un perfil de respuesta de tipo Th2.¹⁹⁵ Además, se ha demostrado que luego de la infección de cardiomiocitos con *T. cruzi*, la cascada Ca^{++} /Calcineurina/NFAT participa en la producción de mediadores inflamatorios como eicosanoides y péptidos vasoactivos asociados al daño cardíaco (COX-2, tromboxano-A2, endotelina-1, péptido atrial natriurético), aunque se desconoce el mecanismo que desencadena esta señalización.¹⁹⁶ Por todo lo expuesto y teniendo en cuenta que en esta tesis se ha demostrado que durante la infección con *T. cruzi* se produce activación de la vía Wnt/ β -catenina y Wnt/ Ca^{++} y que el tratamiento con IWP-L6 es capaz de inhibir la activación de ambas vías, las consecuencias benignas del tratamiento con IWP-L6 en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* sobre la histología y funcionalidad cardíaca podrían deberse al efecto combinado de: a) control de la replicación del parásito; b) inhibición de la activación de la vía Wnt/ β -catenina y la consecuente disminución de macrófagos M2, de la respuesta Th2 y su actividad pro-fibrótica; y c) inhibición de la vía Wnt/ Ca^{++} y la consecuente disminución de la producción de mediadores inflamatorios que inducen daño en miocardio.

En síntesis, en esta tesis se demostró una nueva vía de señalización que se activa durante la interacción entre parásitos protozoarios y las células de la inmunidad innata del huésped. Se demostró que durante la infección con *T. cruzi* se activan las vías de señalización Wnt / β -catenina y Wnt / Calcio, y que éstas promueven tanto la replicación del parásito como el desarrollo de CCC. La inhibición de estas vías promueve el desarrollo de un subtipo especial de macrófagos que se ha denominado M1-like que son muy eficientes para controlar la replicación intracelular del parásito (más eficientes que los clásicos macrófagos activados con LPS e IFN- γ) y capaces de promover una respuesta

sistémica de tipo Th1 que contribuye a la protección en esta infección. A la vez, el bloqueo de la señalización Wnt disminuye la respuesta de tipo Th2 y la función supresora de las células Treg que están involucradas en el desarrollo de fibrosis y en la inhibición de la respuesta protectora Th1, respectivamente (Fig. 45).

Ya que durante la enfermedad de Chagas es necesaria una primera etapa el desarrollo de una respuesta inflamatoria capaz de controlar la replicación de los parásitos y en una segunda etapa el control de esta respuesta para prevenir el desarrollo de la patología inflamatoria, los hallazgos de esta tesis permiten establecer un nuevo marco conceptual que podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas válidas para utilizarse solas o combinadas con fármacos antiparasitarios para el control de la infección y de la patología cardíaca asociada a la enfermedad de Chagas crónica.

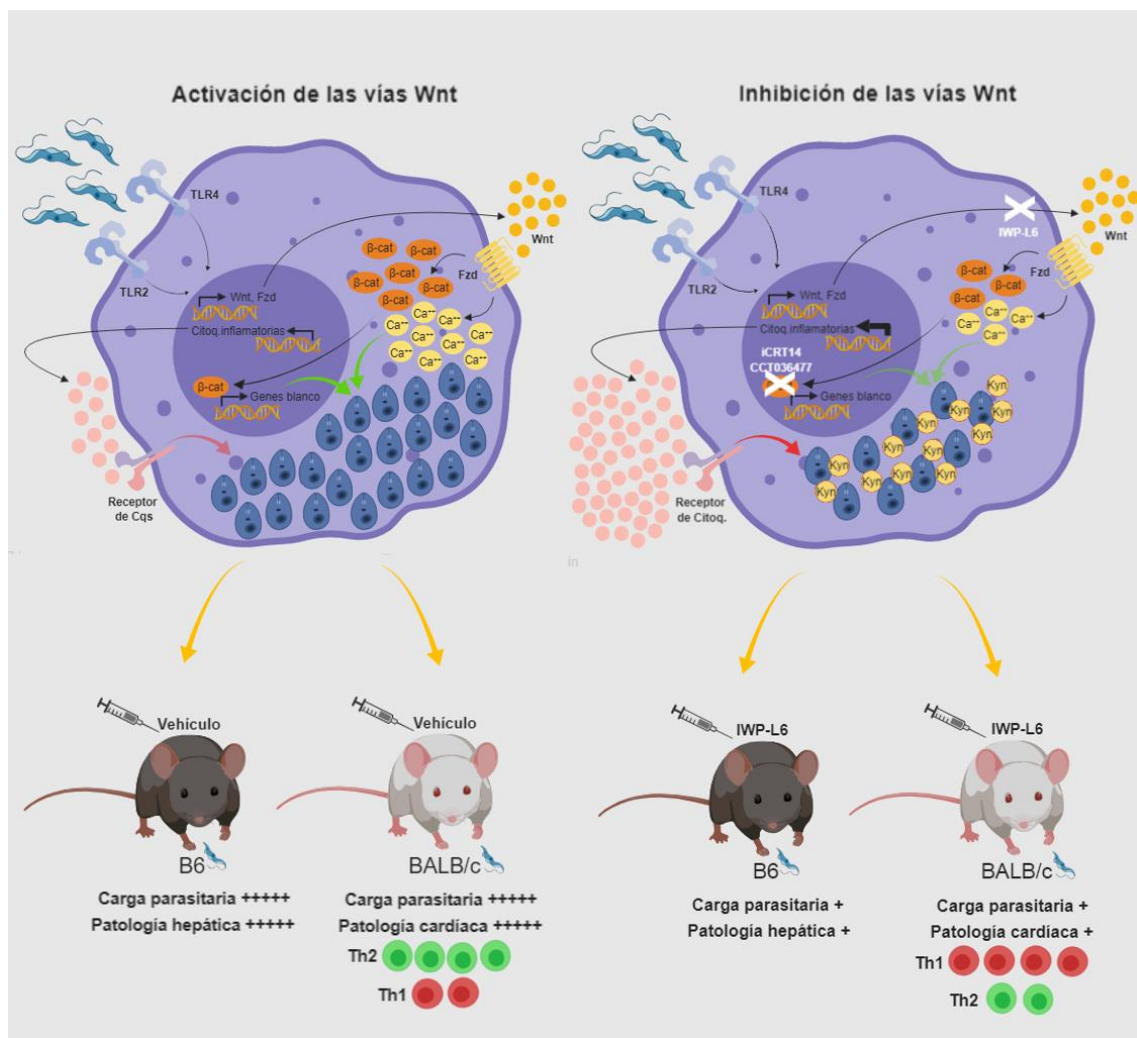


Figura 45 | Resumen de los principales resultados encontrados.

Materiales y Métodos

Ratones y parásitos. Todos los ratones empleados fueron reproducidos y criados en el Bioterio del Dpto. de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC-CIBICI-CONICET. Los ratones BALB/c y B6 fueron obtenidos inicialmente de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA, Buenos Aires, Argentina), mientras que los ratones modificados genéticamente se obtuvieron inicialmente de *Jackson Laboratory* (EEUU).

- **Cepas de ratones empleadas en el desarrollo de esta tesis:**

NOMBRE	BACKGROUND GENÉTICO
BALB/c	<i>BALB/cJ</i>
B6	<i>C57BL/6J</i>
TLR2 ^{-/-}	<i>B6.129-Tlr2^{tm1Kir}/J</i>
TLR4 ^{-/-}	<i>C57BL/10ScNJ</i>
IL-6 ^{-/-}	<i>B6.129S2-Il6^{tm1Kopf}/J</i>
TNF ^{-/-}	<i>B6.129-Tnfrsf1a^{tm1Mak}/J</i>
NLPR3 ^{-/-}	<i>B6.129S6-Nlrp3^{tm1Bhk}/J</i>
IL-10 ^{-/-}	<i>B6.129P2-Il10^{tm1Cgn}/J</i>
IFN- γ ^{-/-}	<i>B6.129S7^{Iing tm1Ts}/J</i>
IFNAR ^{-/-}	<i>B6.129S2-Ifnar1^{tm1Agt}/Mmjax</i>

La cepa Tulahuen de *T. cruzi* se mantuvo en ratones machos BALB/c por inoculaciones intra-peritoneales (ip) de 1.000.000 de tripomastigotes (Tps) en 200 μ L de PBS estéril en un ratón cada 10 días.

Todos los estudios realizados en esta tesis fueron aprobados 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).

Modelos experimentales de infección *in vivo*:

- **Modelo de infección letal en ratones C57BL/6 (B6).** Ratones machos de la cepa C57BL/6 (B6) de 6 a 8 semanas de edad fueron infectados intra-peritonealmente (ip) con 100.000 tripomastigotes (Tps) de la cepa Tulahen de *T. cruzi* diluidos en

200 µl de PBS estéril. Los animales fueron sacrificados a distintos tiempos post-infección según el diseño experimental.

- **Modelo de infección crónica en ratones BALB/c.** Ratones hembras de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad fueron infectados intra-peritonealmente (ip) con 1000 Tps de la cepa Tulahen de *T. cruzi* diluidos en 200 µl de PBS estéril. Los animales fueron sacrificados durante la etapa aguda de la infección (18 días pi) o durante la etapa crónica (180 días pi).
- **Tratamiento *in vivo*.** Ratones B6 ó BALB/c fueron infectados como se indicó anteriormente. El tratamiento con IWP-L6 (7,5 mg/kg) fue administrado por vía ip en los días 5, 8, 11 y 14 post infección (pi).
- **Monitoreo de la infección.** La carga parasitaria en sangre (parasitemia) fue cuantificada en la sangre recolectada de la cola de ratones infectados a diferentes tiempos pi. Los eritrocitos fueron lisados con una solución al 0.87% de cloruro de amonio realizando una dilución 1/20 y los Tps viables (móviles) fueron contados en cámara de Neubauer. Además, los ratones fueron pesados a diferentes tiempos durante el transcurso de la infección y se tuvo en cuenta los días que perecieron para trazar las curvas de sobrevida.
- **Obtención de suero.** La sangre de ratones infectados o controles fue extraída mediante la técnica de sangrado retro-orbital utilizando pipeta pasteur de vidrio heparinizada. La sangre obtenida fue centrifugada a 2300 rpm durante 5 min, se obtuvo el suero y se congeló a -80 °C en alícuotas hasta su utilización.

Reactivos.

CULTIVO CELULAR	MARCA
RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific
Suero Fetal Bovino (SFB)	Natocor
Gentamicina	Farmacia
Glutamax	Thermo Fisher Scientific
ANTICUERPOS WESTERNBLOT	MARCA
β-catenina	Ebioscience
Ser552- β-catenina	Cell Signaling
Wnt3a	Abcam

Wnt5a	Abcam
NFAT2 (NFATc1)	Cell Signaling
Thr286-CAMKII	Cell Signaling
IDO	Abcam
β -actina	Abcam
Tubulina	Santa Cruz
PARP1	Santa Cruz
GAPDH	Santa Cruz
anti-conejo-680	LI-COR Bioscience
anti-ratón-780	LI-COR Bioscience
ANTICUERPOS IFI	MARCA
β -catenina	Ebioscience
NFAT2 (NFATc1)	Cell Signaling
anti-ratón-IgG1-Alexa488	TermoFisher
anti-humano-IgG-FITC	TermoFisher
ANTICUERPOS CITOMETRÍA	MARCA
CD3-APC	Ebioscience
CD4-FITC	Ebioscience
CD11b-PE	Ebioscience
F480-PECy7	Ebioscience
CD25- PECy7	Ebioscience
Foxp3-PE	Ebioscience
IFN- γ -PerCP5.5	Ebioscience
TNF-PE	Ebioscience
IL-4-APC	Ebioscience
IL-5-PE	Ebioscience
IL-10-PE	Ebioscience
TGF- β -PECy7	Ebioscience
ANTICUERPOS ELISA	MARCA
IFN- γ (captura y biotinilado)	BD
TNF (captura y biotinilado)	BD
IL-12 (captura y biotinilado)	BD
IL-4 (captura y biotinilado)	BD

IL-5 (captura y biotinilado)	BD
IL-10 (captura y biotinilado)	BD
TGF- β (captura y biotinilado)	BD
IL-6 (captura y biotinilado)	BD
Streptavidina-HRP	BD
TRATAMIENTOS	MARCA
LiCl	Sigma Aldrich
BIO	TOCRIS
MeBIO	TOCRIS
iCRT14	TOCRIS
CCT036477	Enzo
IWP-L6	Millipore
1-MT	TermoFisher
OTROS	MARCA
Inhibidor de proteasas	Sigma Aldrich
Reactivo de Bradford	BIO RAD
NaCl	Proveeduría Científica
Tritón	Proveeduría Científica
TRIS	ANEDRA
HCl	Proveeduría Científica
HEPES	Sigma Aldrich
KCl	Proveeduría Científica
EDTA	Sigma Aldrich
MgCl	Proveeduría Científica
NaF	Proveeduría Científica
Albúmina sérica bovina (BSA)	Sigma Aldrich
β -mercaptoetanol	Sigma Aldrich
TRIzol	Invitrogen / Sigma Aldrich
SYBR Green	Termo Fisher
Taqman	Applied Biosystems

Cultivos. Todos los cultivos fueron realizados bajo flujos de cabinas con nivel de seguridad tipo 2. Para el cultivo de las células se empleó RMPI 1640 complementado al

10% con suero fetal bovino libre de endotoxinas e inactivado por calor, 2 mM de L-glutamina y 50 µg/ml de Gentamicina (RPMI completo).

- **Mantenimiento de *T. cruzi in vitro*.** Para el mantenimiento de los parásitos *in vitro*, se empleó la línea celular VERO. Las mismas fueron mantenidas en RPMI completo durante sucesivos pasajes en placas adherentes de 90 mm (GBO). Para realizar la infección se emplearon placas al 30-50 % de confluencia, las cuales fueron infectadas con 50 millones de Tps de *T. cruzi*. Luego de la infección, las placas fueron incubadas en estufa durante 48 horas. Al cabo de este tiempo fueron lavadas con PBS a 37 °C y nuevamente suplementadas con RPMI completo fresco. Aproximadamente desde los 6 y hasta los 12 días pi se comenzó a recoger Tps de *T. cruzi* en los sobrenadantes del cultivo.
- **Macrófagos derivados de médula ósea (BMM).** 10 millones de células vivas derivadas de médula ósea de fémur de ratones fueron cultivadas en 10 ml de RPMI completo y suplementado al 20% con sobrenadante de cultivo de células L929 productoras de M-CSF. En el día 3 de cultivo se añadieron 4 ml de medio suplementado con M-CSF como se explicó anteriormente. Los BMM adheridos a las placas bacteriológicas se cosecharon al sexto día de cultivo y se transfirieron a placas de 6 ó 24 pocillos en RPMI completo (sin M-CSF). Se aguardó la adhesión celular durante 24 horas (*resting*) incubando las células toda la noche en una atmósfera de 37°C y 5% de CO₂ en estufa. Posteriormente los BMM se infectaron con Tps de la cepa Tulahuen de *T. cruzi* en una relación BMM:Tps = 1:3. Como control no infectado (NI) se utilizó PBS. Para evaluar la cinética de expresión de diferentes proteínas, los BMM fueron incubados con *T. cruzi* durante diferentes tiempos pi.
- **Línea de macrófagos J774 y línea de monocitos humanos THP1.** La línea de macrófagos J774 fue mantenida en RPMI completo en placas bacteriológicas mientras que la línea THP1 fue mantenida en DMEM completo (suplementado igual que el RPMI). Para diferenciar los monocitos humanos THP1 a macrófagos, estos fueron estimulados durante 24 horas con PMA *plus* ionomicina. La infección de estas células se realizó de la misma manera que se realizó en BMM.
- **Tratamientos *in vitro*.** BMM fueron incubados por 24 h con activadores (LiCl: 10 mM, BIO: 5 µM) o inhibidores transcripcionales específicos de la vía Wnt/β-catenina (iCRT14: 50 µM y CCT036477: 20 µM), el inhibidor de PORCN (IWP-

L6: 20 μ M) y/o el inhibidor de IDO (1-MT: 100 μ M). Como control positivo de la inhibición de la replicación parasitaria intracelular se utilizó LPS 10 μ g/mL *plus* IFN- γ 10 ng/mL que activa a los BMM para controlar la infección. Medio de cultivo con PBS o DMSO se utilizó como control para LiCl ó iCRT14, CCT036477 e IWP-L6 respectivamente. MeBIO se utilizó como control de BIO. El control del tratamiento LPS *plus* IFN- γ se realizó con PBS y DMSO. Las células fueron infectadas con Tps de *T. cruzi* (BMM:Tps = 1:3), y luego de 24 horas de infección se realizaron homogenatos celulares y se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos para ensayos posteriores.

- **Células de bazo.** Los bazos de los ratones fueron extraídos en esterilidad en cápsulas de Petri de 60 mm conteniendo 5 mL de PBS-2%SFB y pesados. Los órganos fueron disgregados mecánicamente sobre una malla de acero inoxidable (mesh) con la ayuda de un émbolo y la suspensión celular fue centrifugada. El pellet se incubó por 5 minutos en Buffer de lisis estéril (Buffer Tris-HCl, pH 7.5 conteniendo 8.3 g/L de cloruro de amonio) para lisar los glóbulos rojos. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con RPMI, resuspendidas en medio de cultivo completo y conservadas en hielo hasta su utilización. Por último, las células fueron cuantificadas por recuento en cámara de Neubauer utilizando el colorante supravital azul de tripán para evaluar su viabilidad. Para evaluar el porcentaje de células productoras de citoquinas, se cultivaron 1 millón de células en placas de 96 pocillos en presencia de brefeldina-monensina y empleando como estímulo PMA *plus* ionomicina o lisado antigénico de *T. cruzi* durante 4 horas. Para evaluar la producción de citoquinas en los sobrenadantes de cultivos, se cultivaron 4 millones células en placas de 24 pocillos en presencia de PMA *plus* ionomicina o lisado antigénico de *T. cruzi* empleando PBS como control de cada condición durante 72 horas.
- **Ensayo de supresión.** Para determinar el efecto del tratamiento con IWP-L6 sobre la funcionalidad de células Treg, se obtuvieron células de bazo de ratones sin infectar y de ratones infectados controles o tratados. Posteriormente, se purificaron mediante la técnica de *Cell-Sorting* células CD4+CD25- provenientes de un pool de bazos de ratones sin infectar (células efectoras convencionales) y células CD4+CD25+ provenientes de un pool de bazos de ratones infectados controles o de un pool de bazos de ratones infectados tratados con IWP-L6 (células supresoras). Las células efectoras (que poseen la capacidad de proliferar

ante estímulos) purificadas de ratones sin infectar fueron marcadas con CFSE y posteriormente se sembraron en una placa de 96 pocillos previamente incubada durante toda la noche con anti-CD3 y anti-CD28 a 4 °C (estímulos que inducen su proliferación). Posteriormente se agregaron a los pocillos diferentes concentraciones de células supresoras purificadas de ratones tratados con IWP-L6 o controles para evaluar su capacidad para controlar la proliferación de las células efectoras estimuladas. La proliferación celular fue evaluada luego de 4 días de co-cultivo como la dilución del colorante CFSE empleando el citómetro FACS CANTO II. El 100% de proliferación fue establecido por la máxima proliferación alcanzada por células efectoras cultivadas solas (en ausencia de células supresoras) en presencia del estímulo. El porcentaje de supresión se calculó como 100-% de proliferación.

Citometría de flujo. Para realizar la marcación de superficie, 1 millón de células fueron incubadas con los anticuerpos de superficie marcados con fluoróforos diluidos en buffer de tinción PBS-2%SFB a un volumen final de 25 µL por 30 minutos a 4°C y luego lavadas. Luego se realizó la fijación y permeabilización de las células siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante para permitir que los anticuerpos intracelulares ingresen. Finalmente, las células fueron re-suspendidas y adquiridas en el citómetro de flujo FACS CANTO II. En todos los ensayos se adquirieron entre 100.000 y 500.000 eventos y se incluyeron controles de isotipo como así también controles FMO. Los datos fueron analizados mediante el software FlowJo.

Extracción de proteínas totales: Las muestras de proteínas totales procedentes de homogenatos de BMM o de bazo de ratones, fueron obtenidas con el buffer de lisis RIPA (50 ml H₂O mQ; 0.44 gr NaCl; 0.05 gr SDS; 500 µl Tritón; 0.3 gr TRIS; pH=7.2 con HCl 1N) incluyendo inhibidores de proteasas. Luego del agregado del buffer, los homogenatos fueron vortexeados suavemente durante 10 segundos y posteriormente se incubaron en hielo durante 40 minutos. Finalmente, se centrifugaron a 14.000 g a 4°C durante 15 minutos y se recolectó el sobrenadante proteico. Los extractos fueron almacenados a -80°C.

Extracción de proteínas citoplasmáticas y nucleares: Las muestras de proteínas presentes en citosol fueron obtenidas agregando a los homogenatos de BMM 100 μ l de Buffer A (10 mM HEPES; 10 mM KCl; 1 mM EDTA; 1.5 mM MgCl₂; 5 mM NaF). Después de incubar las muestras durante 15 minutos a 4°C se añadió NP-40 al 0.5% y los tubos se agitaron suavemente durante 10 segundos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 13.000 g durante 5 minutos y se obtuvo del sobrenadante la fracción proteica citoplasmática. Luego de dos lavados con PBS, el sedimento fue resuspendido en 50 μ l de Buffer B (20 mM Hepes; 5mM NaF; 0.4 M NaCl) y se agitó en vórtex cada 10 segundos durante 15 minutos. Finalmente las muestras fueron centrifugadas a 13.000 g durante 5 min y se recogió la fracción de proteínas nucleares del sobrenadante. Los extractos fueron almacenados a -80°C.

Medición de la concentración proteica: La concentración de proteínas se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford empleando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (BIO-RAD) y diluciones de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich) como testigos para realizar la curva de calibración.

Western blot: Se procedió a preparar el buffer tapón de muestra empleando Sample Buffer 6X y β -mercaptoetanol. Las proporciones empleadas para preparar el buffer de muestra fueron 83% Sample Buffer y 17 % β -mercaptoetanol. Posteriormente el buffer de muestra 6X fue incorporado a los extractos proteicos. La cantidad de proteínas que se preparó por condición para ser posteriormente sembrada en cada pocillo del gel fue 50 μ g. Las muestras ya preparadas fueron incubadas a 100°C durante 3 minutos y posteriormente se sembraron iguales cantidades de proteínas en gel SDS-PAGE al 10%. La corrida electroforética fue realizada a voltaje constante durante 1 hora y 150 V. Luego los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa (BIO RAD) a voltaje constante durante 80 minutos y 100 V. Luego de la transferencia, las membranas conteniendo las proteínas se bloquearon con leche descremada en polvo al 5% en TBS-Tween 0.1% y se incubaron toda la noche a 4°C en presencia del anticuerpo primario.

Los anticuerpos primarios empleados fueron: anti- β -catenina, anti-Ser552- β -catenina, anti-Thr286-CAMKII, anti-NFATc1, anti-Wnt3a, anti-Wnt5a, anti-IDO. Como controles

de carga se emplearon anticuerpos anti- β -actina, anti- α -tubulina, anti-parp1 y anti-GAPDH.

Finalmente, se realizó una incubación con anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo o de ratón marcados con fluoróforos (LI-COR Biosciences). Las marcas fueron reveladas utilizando el equipo Odyssey® (LI-COR Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. La intensidad de cada banda fue analizada utilizando el programa Fiji/ImageJ.

Inmunofluorescencia. Se emplearon placas de 24 pocillos a las que se les agregaron al fondo de cada pocillo un vidrio *cover* redondo estéril. Posteriormente se sembró un millón de células en 1 mL de RPMI completo. Se esperó 24 horas a que las células se adhirieran a la placa, se infectaron con Tps de *T. cruzi* (Tps:Mo=3:1) y se incubaron *in vitro* por 24 horas. Los cultivos fueron lavados para remover los Tps no internalizados y se les volvió a colocar RPMI suplementado. Luego de 48 horas más de cultivo, se retiraron las placas de las estufas y se comenzó el protocolo de tinción.

Las células fueron fijadas con 200 μ L de formaldehído al 4% durante 40 minutos, se lavaron con PBS y luego se permeabilizaron con 200 μ L de Tritón al 1% por 15 minutos. Posteriormente se realizó el bloqueo de los pocillos con BSA preparada al 5% en PBS.

- **Inmunofluorescencia de parásitos.** El número de parásitos intracelulares se evaluó incubando las células toda la noche con suero de un paciente con enfermedad de Chagas crónica y se reveló con anti-IgG humana marcada con FITC. Los núcleos fueron teñidos con DAPI durante 10 minutos. Finalmente, se tomaron fotografías en microscopio Nikon TE200U con objetivo 100X, y se realizaron cuantificaciones empleando el programa Fiji/ImageJ.
- **Inmunolocalización de proteínas.** La localización celular de β -catenina fue evaluada por IFI utilizando como anticuerpo primario anticuerpo anti- β -catenina o anti-NFATc1 y DAPI para teñir los núcleos. Los preparados se visualizaron mediante microscopía confocal de exploración por láser empleando Olympus FV1000 a una visual final de 1200X. Los análisis de imágenes se realizaron con el programa Fiji/ImageJ, empleando el método de análisis de colocación de Mander's.

PCR en Tiempo Real (q-PCR). Se extrajo ARN total de homogenatos celulares o de tejidos utilizando TRIzol de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La q-PCR se realizó empleando RT-PCR SYBR Green de acuerdo con las instrucciones del fabricante en el equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Se utilizó 5 µl de una dilución 1:5 de ARN retro-transcripto (proveniente de un total de 2 µg) en una mezcla de reacción conteniendo 4,5 µl de H₂O, 7,5 µl de Master Mix SYBR Green, 0,5 µl de cebador directo (10 mM) y 0,5 µl de cebador inverso (10 mM). Los ciclos fueron: 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 seg y 60 °C por 1 min. La especificidad de los productos obtenidos fue confirmada mediante el análisis de la curva de fusión y por electroforesis en gel de agarosa. Los cebadores específicos fueron:

Gene	Sentido	Antisentido
<i>Wnt3a</i>	5'-TTCTTACTTGAGGGCGGAGA-3'	5'- CTGTCGGGTCAAGAGAGGAG-3'
<i>Wnt5a</i>	5'-GCAGGACTTTCTCAAGGACA-3'	5'-CCCTGCCAAAGACAGAAGTA-3'
<i>Ctnnb1</i>	5'-AGCCGAGATGGCCAGAAT-3'	5'-AAGGGCAAGGTTTCGAATCAA-3'
<i>Ccnd1</i>	5'-AGTGCGTGCAGAAGGAGATT-3'	5'-CACAACTTCTCGGCAGTCAA-3'
<i>Axin1</i>	5'-CTGGGCTGTATCCCACTGT-3'	5'-ACCAAGCTGGTGGCTAGAGA-3'
<i>Wisp1</i>	5'-CTGGACAGAAAAGGGCATGT-3'	5'-CTGGACAGAAAAGGGCATGT-3'
<i>Fzd4</i>	5' CTGCAGCATGCCTAATGAGA-3'	5'-CGTCTGCCTAGATGCAATCA-3'
<i>Fzd6</i>	5'-TCCGACGCTTGAAGAAA-3'	5'- CAACCCAGGTCCTCAAGTA-3'
<i>Fzd8</i>	5'-GCAGCATGTTGCTATGAAA-3'	5'- AGTAGCCTGCTATGGCCTCA-3'
<i>Fzd9</i>	5'- AGAGCCTGTGCTACCGAAAA-3'	5'- CAAGGAGGGAGCAACCATAA-3'
<i>β-actina</i>	5'-CGCCACCAGTTCGCCATGGA-3'	5'-TACAGCCCGGGGAGCATCGT-3'

Para evaluar la carga parasitaria de *T. cruzi* en tejidos, la RT-qPCR se llevó a cabo utilizando sondas Taqman. En este caso, la secuencia de los cebadores y las sondas fueron específicas para hibridar con la región del ADN satélite de *T. cruzi* (GenBank AY520036). Como control endógeno se utilizó una sonda específica para GAPDH. Todas las sondas empleadas se reportaron con el fluoróforo FAM. La determinación se realizó en una muestra “pool” conformada por muestras de ADN de entre 3 a 7 animales mezcladas proporcionalmente a fin de alcanzar los 2 µg de ADN total. El ADN de los “pools”, las sondas adecuadas y la Taqman Mix, se mezclaron a un volumen final de reacción de 15 µL. Se utilizó el equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

En todos los casos, las determinaciones de cada condición se realizaron por triplicado. Los resultados se analizaron utilizando el software StepOne para obtener los valores de Ct y la hoja de cálculos Excel para aplicar el método comparativo por cálculo del $\delta\delta\text{CT}$. Para ello, el ciclo de amplificación en el cual la fluorescencia atravesó el umbral (CT) se promedió entre los triplicados. Luego, la cantidad de ADN del gen target se normalizó a la del gen endógeno, al calcular para cada muestra el $\delta\text{CT} = \text{CT target} - \text{CT endógeno}$. A continuación, se determinó la diferencia entre el δCT para el grupo tratado y el grupo control de cada experimento ($\delta\delta\text{CT}$), y finalmente, se utilizó la fórmula $\text{fold change} = 2^{-\delta\delta\text{CT}}$ para calcular la cantidad relativa del gen presente en las muestras del grupo tratado respecto a las del grupo control.

RT-PCR array. Se analizó la expresión comparativa en BMM infectados y sin infectar de un panel de 84 genes relacionados a las vías de activación Wnt utilizando PAMM-043ZC RT² ProfilerTM PCR array de Qiagen de acuerdo con el protocolo provisto por el fabricante, utilizando el sistema StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Los datos fueron analizados utilizando el centro de análisis de la plataforma web de Qiagen.

Determinación de la actividad de iNOS. La producción de ON fue medida indirectamente cuantificando la producción de nitritos utilizando el reactivo de Griess mezclando 50 μL de muestra, 25 μL de Reactivo A y 25 μL de Reactivo B. Las muestras empleadas fueron sobrenadantes de cultivos en los que se emplearon RPMI 1640 sin rojo fenol, o lisados de corazones perfundidos incubados 1 hora en buffer RIPA (1:30).

Determinación de la actividad deIDO. BMM fueron re-suspendidos en PBS frío para ser disgregados por ciclos de sonicación de 30 segundos en baño de hielo a una potencia de 100W. El homogenato obtenido fue centrifugado a 800g durante 10 minutos a 4°C, para luego separar el sobrenadante, que nuevamente se centrifugó a 15.000g durante 15 min a 4°C. Dicho sobrenadante fue empleado para la determinación colorimétrica de la actividad deIDO, como fue descripto previamente.

Determinación de citoquinas. La concentración de citoquinas (pg/mL) se determinó en suero o sobrenadantes de cultivos mediante la técnica de ELISA, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Placas *half* área fueron sensibilizadas con los correspondientes anticuerpos de captura según la citoquina a determinar en buffer 0.1 M carbonato-bicarbonato pH 9.6 para TNF o en 0.1 M de Na₂HPO₄ a pH 9 para el resto de las citoquinas, durante toda la noche a 4°C. Luego de lavar con PBS-Tween-20 al 0.05%, las placas fueron bloqueadas con PBS-0.05% Tween-1% BSA para la determinación de TGF-β ó PBS-0.05% Tween-10% BSA para el resto de las citoquinas evaluadas, durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas fueron vaciadas y las muestras junto con los testigos convenientemente diluidos en la solución de bloqueo fueron incubados durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, luego de repetidos lavados con PBS-0.05% Tween, los anticuerpos biotinilados de ratón correspondiente a cada citoquina fueron incubados durante 1 hora a 37°C. Por último, luego de lavados se incubó con el conjugado Streptavidina-HRP diluido en solución de bloqueo durante 45 minutos a temperatura ambiente. La reacción se reveló agregando el reactivo TMB como sustrato y deteniendo la misma con ácido sulfúrico 1N. La densidad óptica fue medida en un lector de ELISA (Microplate Reader 450, BIO RAD) a 450 nm.

La concentración de cada citoquina fue determinada utilizando como referencia a curvas de trabajo realizadas con estándares de origen murino. El límite de detección para las determinaciones fue entre 15-20 pg/mL.

Determinación de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi*. Para la determinación de IgG1 e IgG2a específicas para *T. cruzi*, placas *half* área fueron sensibilizadas toda la noche a 4°C con un lisado antigénico de *T. cruzi* obtenido por 30 segundos de sonicación de parásitos cultivados *in vitro*, a una concentración 25 µg/mL en buffer carbonato-bicarbonato pH 9.6. A continuación, luego de lavar con PBS-Tween al 0.05%, las placas fueron bloqueadas con PBS-0.05%-1% BSA durante 2 horas a 37°C. Luego las placas fueron vaciadas y los sueros convenientemente diluidos en la solución de bloqueo desde 1:50 hasta 1:1600, fueron incubados durante una hora a 37°C. Posteriormente se realizaron nuevamente dos lavados, y se agregaron los anticuerpos biotinilados anti-IgG1 e -IgG2a durante 1 hora a 37°C. Por último, luego de repetidos lavados se incubó con el

conjugado Streptavidina-HRP diluido en solución de bloqueo durante 45 minutos a temperatura ambiente. La reacción se reveló agregando el reactivo TMB como sustrato y deteniendo la misma con ácido sulfúrico 1N. La densidad óptica fue medida en un lector de ELISA (Microplate Reader 450, BIO RAD) a 450 nm. El punto de corte (título) se determinó con la media aritmética de las densidades ópticas (DO) de las muestras de ratones controles más dos desviaciones estándar. Se consideraron positivos los valores de DO de las muestras problemas que estuvieron sobre el valor del punto de corte.

Cortes histológicos. Los órganos fueron extraídos de ratones a diferentes tiempos post-infección y fueron fijados en solución histológica (formol al 10% en PBS). El procesamiento de los órganos fue realizado en el laboratorio de anátomo-patología del Instituto Oulton a quienes se les solicitó la tinción de hematoxilina-eosina para poder observar infiltrado inflamatorio y conservación del parénquima normal de los tejidos. Los cortes fueron observados mediante microscopía de campo claro utilizando un microscopio Nikon TE200U (1000X).

Electrocardiogramas (ECG). Los electrocardiogramas fueron desarrollados durante la etapa crónica de la infección en ratones BALB/c luego de 180 días pi. Los trazados de los ECG se obtuvieron con potenciales estándar registrados a 50 mm/s con amplitud 1 mV/10 mm utilizando el electrocardiógrafo Contec ECG100G. Estos estudios fueron realizados en colaboración con el Prof. Dr. Héctor Walter Rivarola en la Cátedra de Física Biomédica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Como controles de los parámetros normales de estos ratones, se emplearon ratones BALB/c sin infectar de la misma edad que los ratones de los grupos experimentales. Las alteraciones encontradas fueron evaluadas como previamente.

Ecocardiogramas. Los electrocardiogramas fueron desarrollados durante la etapa crónica de la infección en ratones BALB/c luego de 180 días pi. Los diámetros diastólicos (DD) y sistólicos (DS) internos del ventrículo izquierdo (VI) se estudiaron utilizando un ecógrafo digital Logiq VDTM. La fracción de acortamiento del VI fue obtenida calculando $((DDVI-DSVI)/DDVI) \times 100$ y el volumen de eyección fue calculado a partir

de los mismos parámetros utilizando la fórmula de Teichholz. Estos estudios fueron realizados en colaboración con el Méd. Fernando Alfonso en la Cátedra de Física Biomédica de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

Análisis estadístico. Todos los ensayos fueron realizados entre 2 y 4 veces y expresados como valores promedio \pm SEM. Los datos comparativos entre 2 grupos fueron analizados mediante el test *t* de Student. Los análisis entre más de 2 grupos fueron realizados utilizando el test ANOVA seguido de Bonferroni post-test. Los ensayos de supervivencia fueron analizados utilizando el método de Kaplan-Meier. Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el software GraphPad Prism7. Los resultados se consideraron significativamente diferentes cuando $p < 0,05$.

Referencias bibliográficas

1. Rassi, A., Rassi, A. & Marin-Neto, J. A. Chagas disease. *The Lancet* **375**, 1388–1402 (2010).
2. Puchades, M. T. G. & Albornoz, A. O. C. D. Chagas disease in a wormy world. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.* **71**, 5–13 (2012).
3. Salvatella, R., Irabedra, P., Sánchez, D., Castellanos, L. G. & Espinal, M. South-south cooperation for Chagas disease. *The Lancet* **382**, 395–396 (2013).
4. Junqueira, C. *et al.* The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev. Mol. Med.* **12**, (2010).
5. Chatelain, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J. Biomol. Screen.* **20**, 22–35 (2015).
6. Marchione, D. V. Chagas Disease Symptoms and Treatment. *Bel Marra Health - Breaking Health News and Health Information* (2016). Available at: <https://www.belmarrahealth.com/chagas-disease-vaccine-potential-after-study-identifies-how-it-evades-immune-system/>. (Accessed: 29th November 2018)
7. Abel, L. C. *et al.* Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Autoimmun.* **17**, 99–107 (2001).
8. Higuchi, M. de L., Benvenuti, L. A., Martins Reis, M. & Metzger, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc. Res.* **60**, 96–107 (2003).
9. Tanowitz, H. B. *et al.* Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-Induced Heart Disease (Chagas Disease). *Prog. Cardiovasc. Dis.* **51**, 524–539 (2009).
10. Bilate, A. M. B. & Cunha-Neto, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **50**, 67–74 (2008).

11. 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).
12. Leibson, H. J., Geffer, M., Zlotnik, A., Marrack, P. & Kappler, J. W. Role of gamma-interferon in antibody-producing responses. *Nature* **309**, 799–801 (1984).
13. Hirahara, K. & Nakayama, T. CD4 + T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the T_h 1/T_h 2 paradigm. *Int. Immunol.* **28**, 163–171 (2016).
14. Cardoso, M. S., Reis-Cunha, J. L. & Bartholomeu, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Front. Immunol.* **6**, (2016).
15. DosReis, G. A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **44**, 84–90 (2011).
16. Roche, P. A. & Furuta, K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 203–216 (2015).
17. Rodrigues, M. M., Oliveira, A. C. & Bellio, M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *J. Parasitol. Res.* **2012**, (2012).
18. 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).
19. 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).
20. Knubel, C. P. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.* **24**, 2689–2701 (2010).

21. Millar, A. E. & Kahn, S. J. Trypanosoma cruzi: The Effect of Nitric Oxide Synthesis Inhibition on the CD4 T Cell Response to the trans-Sialidase Superfamily. *Exp. Parasitol.* **94**, 84–91 (2000).
22. Gutierrez, F. R., Mineo, T. W., Pavanelli, W. R., Guedes, P. M. & Silva, J. S. The effects of nitric oxide on the immune system during Trypanosoma cruzi infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104**, 236–245 (2009).
23. Vespa, G. N., Cunha, F. Q. & Silva, J. S. Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun.* **62**, 5177–5182 (1994).
24. Munder, M., Eichmann, K. & Modolell, M. Alternative Metabolic States in Murine Macrophages Reflected by the Nitric Oxide Synthase/Arginase Balance: Competitive Regulation by CD4+ T Cells Correlates with Th1/Th2 Phenotype. *J. Immunol.* **160**, 5347–5354 (1998).
25. Cardillo, F. *et al.* B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection. *Immunology* **122**, 584–595 (2007).
26. Basso, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World J. Exp. Med.* **3**, 1–10 (2013).
27. Machado, F. S. *et al.* Current Understanding of Immunity to Trypanosoma cruzi Infection and Pathogenesis of Chagas Disease. *Semin. Immunopathol.* **34**, 753–770 (2012).
28. 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).

29. 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).
30. Mariano, F. S. *et al.* The involvement of CD4⁺CD25⁺ T cells in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection. *Microbes Infect.* **10**, 825–833 (2008).
31. Bonney, K. M., Taylor, J. M., Thorp, E. B., Epting, C. L. & Engman, D. M. Depletion of regulatory T cells decreases cardiac parasitosis and inflammation in experimental Chagas disease. *Parasitol. Res.* **114**, 1167–1178 (2015).
32. Kotner, J. & Tarleton, R. Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of Trypanosoma cruzi infection in mice. *Infect. Immun.* **75**, 861–869 (2007).
33. 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).
34. Boscardin, S. B. *et al.* Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 1373–1384 (2010).
35. Trinchieri, G. & Sher, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 179–190 (2007).
36. Campos, M. A. *et al.* Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 416–423 (2001).
37. Ouaisi, A. *et al.* The Trypanosoma cruzi Tc52-Released Protein Induces Human Dendritic Cell Maturation, Signals Via Toll-Like Receptor 2, and Confers Protection Against Lethal Infection. *J. Immunol.* **168**, 6366–6374 (2002).

38. Shoda, L. K. M. *et al.* DNA from Protozoan Parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* Is Mitogenic for B Lymphocytes and Stimulates Macrophage Expression of Interleukin-12, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Nitric Oxide. *Infect. Immun.* **69**, 2162–2171 (2001).
39. Silva, G. K. *et al.* Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 1148–1152 (2010).
40. Monteiro, A. C. *et al.* Bradykinin B2 Receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by *Trypanosoma cruzi*, are critical for the development of protective type-1 responses. *PLoS Pathog.* **3**, e185 (2007).
41. Mantovani, Alberto, Sica, Antonio & Locati, M. Macrophage Polarization Comes of Age. *Immunity* **23**, 344–346 (2005).
42. Zanluqui, N. G. Macrophage Polarization in Chagas Disease. *J. Clin. Cell. Immunol.* **06**, (2015).
43. Golden, J. M. & Tarleton, R. L. *Trypanosoma cruzi*: Cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Exp. Parasitol.* **72**, 391–402 (1991).
44. Flamme, A. C. L., Kahn, S. J., Rudensky, A. Y. & Voorhis, W. C. V. *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages are defective in major histocompatibility complex class II antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3085–3094 (1997).
45. Stempin, C., Giordanengo, L., Gea, S. & Cerbán, F. Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 727–734 (2002).
46. Stempin, C. C., Tanos, T. B., Coso, O. A. & Cerbán, F. M. Arginase induction promotes *Trypanosoma cruzi* intracellular replication in Cruzipain-treated J774 cells

- through the activation of multiple signaling pathways. *Eur. J. Immunol.* **34**, 200–209 (2004).
47. Stempin, C. C., Dulgerian, L. R., Garrido, V. V. & Cerban, F. M. Arginase in Parasitic Infections: Macrophage Activation, Immunosuppression, and Intracellular Signals. *BioMed Research International* (2010). doi:10.1155/2010/683485
48. Nusse, R. Wnt Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a011163 (2012).
49. Nusse, R. Cell signalling: Disarming Wnt. *Nature* **519**, 163–164 (2015).
50. Gordon, M. D. & Nusse, R. Wnt Signaling: Multiple Pathways, Multiple Receptors, and Multiple Transcription Factors. *J. Biol. Chem.* **281**, 22429–22433 (2006).
51. Nusse, R. & Clevers, H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* **169**, 985–999 (2017).
52. Wiese, K. E., Nusse, R. & Amerongen, R. van. Wnt signalling: conquering complexity. *Development* **145**, dev165902 (2018).
53. De, A. Wnt/ Ca^{2+} signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **43**, 745–756 (2011).
54. Verheyen, E. M. & Gottardi, C. J. Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by protein kinases. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **239**, 34–44 (2010).
55. Amerongen, R. van, Mikels, A. & Nusse, R. Alternative Wnt Signaling Is Initiated by Distinct Receptors. *Sci Signal* **1**, re9–re9 (2008).
56. Gupta, P., Srivastav, S., Saha, S., Das, P. K. & Ukil, A. *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis and pro-inflammatory response through AKT-mediated regulation of β -catenin and FOXO-1. *Cell Death Differ.* **23**, 1815–1826 (2016).
57. Schaale, K., Neumann, J., Schneider, D., Ehlers, S. & Reiling, N. Wnt signaling in macrophages: Augmenting and inhibiting mycobacteria-induced inflammatory responses. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 553–559 (2011).

58. Blumenthal, A. *et al.* The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood* **108**, 965–973 (2006).
59. Katoh, M. & Katoh, M. STAT3-induced WNT5A signaling loop in embryonic stem cells, adult normal tissues, chronic persistent inflammation, rheumatoid arthritis and cancer (Review). *Int. J. Mol. Med.* **19**, 273–278 (2007).
60. Binder, F., Hayakawa, M., Choo, M.-K., Sano, Y. & Park, J. M. Interleukin-4-induced β -catenin regulates the conversion of macrophages to multinucleated giant cells. *Mol. Immunol.* **54**, 157–163 (2013).
61. McGuire, V. A. *et al.* Cross Talk between the Akt and p38 Pathways in Macrophages Downstream of Toll-Like Receptor Signaling. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 4152–4165 (2013).
62. Guha, M. & Mackman, N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 32124–32132 (2002).
63. Androulidaki, A. *et al.* The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity* **31**, 220–231 (2009).
64. Martin, M., Rehani, K., Joep, R. S. & Michalek, S. M. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat. Immunol.* **6**, 777–784 (2005).
65. Schabbauer, G., Tencati, M., Pedersen, B., Pawlinski, R. & Mackman, N. PI3K-Akt pathway suppresses coagulation and inflammation in endotoxemic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1963–1969 (2004).
66. Pourrajab, F., Yazdi, M. B., Zarch, M. B., Zarch, M. B. & Hekmatimoghaddam, S. Cross talk of the first-line defense TLRs with PI3K/Akt pathway, in preconditioning therapeutic approach. *Mol. Cell. Ther.* **3**, (2015).

67. Martin, M. *et al.* Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**, 717–725 (2003).
68. Wang, H., Brown, J. & Martin, M. Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response. *Cytokine* **53**, 130–140 (2011).
69. Chuenkova, M. V. & PereiraPerrin, M. Trypanosoma cruzi Targets Akt in Host Cells as an Intracellular Antiapoptotic Strategy. *Sci Signal* **2**, ra74–ra74 (2009).
70. Caradonna, K. L., Engel, J. C., Jacobi, D., Lee, C.-H. & Burleigh, B. A. Host Metabolism Regulates Intracellular Growth of Trypanosoma cruzi. *Cell Host Microbe* **13**, 108–117 (2013).
71. Chae, W.-J. & Bothwell, A. L. M. Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling in Immune Cells. *Trends Immunol.* **39**, 830–847 (2018).
72. Manicassamy, S. *et al.* Activation of β -Catenin in Dendritic Cells Regulates Immunity Versus Tolerance in the Intestine. *Science* **329**, 849–853 (2010).
73. Suryawanshi, A., Tadagavadi, R. K., Swafford, D. & Manicassamy, S. Modulation of Inflammatory Responses by Wnt/ β -Catenin Signaling in Dendritic Cells: A Novel Immunotherapy Target for Autoimmunity and Cancer. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
74. Oderup, C., LaJevic, M. & Butcher, E. C. Canonical and non-canonical Wnt proteins program dendritic cell responses for tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 6126–6134 (2013).
75. Zhao, F. *et al.* Paracrine Wnt5a- β -Catenin Signaling Triggers a Metabolic Program that Drives Dendritic Cell Tolerization. *Immunity* **48**, 147-160.e7 (2018).
76. Valencia, J. *et al.* Wnt5a signaling increases IL-12 secretion by human dendritic cells and enhances IFN- γ production by CD4⁺ T cells. *Immunol. Lett.* **162**, 188–199 (2014).

77. Naskar, D. *et al.* Wnt5a-Rac1-NF- κ B homeostatic circuitry sustains innate immune functions in macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**, 4386–4397 (2014).
78. Bergenfelz, C. *et al.* Wnt5a Induces a Tolerogenic Phenotype of Macrophages in Sepsis and Breast Cancer Patients. *J. Immunol.* **188**, 5448–5458 (2012).
79. Yeo, E.-J. *et al.* Myeloid WNT7b mediates the angiogenic switch and metastasis in breast cancer. *Cancer Res.* **74**, 2962–2973 (2014).
80. Vannella, K. M. & Wynn, T. A. Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annu. Rev. Physiol.* **79**, 593–617 (2017).
81. Sennello, J. A. *et al.* Lrp5/ β -Catenin Signaling Controls Lung Macrophage Differentiation and Inhibits Resolution of Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **56**, 191–201 (2017).
82. Lam, A. P. *et al.* Wnt coreceptor Lrp5 is a driver of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **190**, 185–195 (2014).
83. Palevski, D. *et al.* Loss of Macrophage Wnt Secretion Improves Remodeling and Function After Myocardial Infarction in Mice. *J. Am. Heart Assoc.* **6**, (2017).
84. Saha, S. *et al.* Macrophage-derived extracellular vesicle-packaged WNTs rescue intestinal stem cells and enhance survival after radiation injury. *Nat. Commun.* **7**, 13096 (2016).
85. Cosín Roger, J. *et al.* M2 Macrophages Activate WNT Signaling Pathway in Epithelial Cells: Relevance in Ulcerative Colitis. *Cosín Roger Jesús Ortiz Masiá María Dolores Calatayud Romero Sara Hernández Carlos Alvarez Rivelles Angeles Hinojosa Joaquin Esplugues Juan Vicente Barrachina Sancho María Dolores 2013 M2 Macrophages Act. WNT Signal. Pathw. Epithel. Cells Relev. Ulcerative Colitis Plos One 8 10 E78128 (2013). doi:http://dx.doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0078128*

86. Lin, S.-L. *et al.* Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4194–4199 (2010).
87. Boulter, L. *et al.* Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat. Med.* **18**, 572–579 (2012).
88. Qi, H. T follicular helper cells in space-time. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 612–625 (2016).
89. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–564 (2012).
90. Gullicksrud, J. A. *et al.* Differential Requirements for Tcf1 Long Isoforms in CD8+ and CD4+ T Cell Responses to Acute Viral Infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **199**, 911–919 (2017).
91. Yu, Q. *et al.* T cell factor 1 initiates the T helper type 2 fate by inducing the transcription factor GATA-3 and repressing interferon- γ . *Nat. Immunol.* **10**, 992–999 (2009).
92. Notani, D. *et al.* Global Regulator SATB1 Recruits β -Catenin and Regulates TH2 Differentiation in Wnt-Dependent Manner. *PLOS Biol.* **8**, e1000296 (2010).
93. Trischler, J. *et al.* Immune Modulation of the T Cell Response in Asthma through Wnt10b. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **54**, 584–593 (2016).
94. Choi, Y. S. *et al.* LEF-1 and TCF-1 orchestrate T(FH) differentiation by regulating differentiation circuits upstream of the transcriptional repressor Bcl6. *Nat. Immunol.* **16**, 980–990 (2015).
95. Wu, T. *et al.* TCF1 is required for the T follicular helper cell response to viral infection. *Cell Rep.* **12**, 2099–2110 (2015).
96. Yu, Q., Sharma, A., Ghosh, A. & Sen, J. M. T Cell Factor-1 Negatively Regulates Expression of IL-17 Family of Cytokines and Protects Mice from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* **186**, 3946–3952 (2011).

97. Sorcini, D. *et al.* Wnt/ β -Catenin Signaling Induces Integrin $\alpha 4\beta 1$ in T Cells and Promotes a Progressive Neuroinflammatory Disease in Mice. *J. Immunol.* **199**, 3031–3041 (2017).
98. Muranski, P. *et al.* Th17 Cells Are Long Lived and Retain a Stem Cell-like Molecular Signature. *Immunity* **35**, 972–985 (2011).
99. Ghosh, M. C. *et al.* Activation of Wnt5A signaling is required for CXC chemokine ligand 12-mediated T-cell migration. *Blood* **114**, 1366–1373 (2009).
100. Wang, S. *et al.* Amphiregulin Confers Regulatory T Cell Suppressive Function and Tumor Invasion via the EGFR/GSK-3 β /Foxp3 Axis. *J. Biol. Chem.* **291**, 21085–21095 (2016).
101. Hao, H. *et al.* FGF23 promotes myocardial fibrosis in mice through activation of β -catenin. *Oncotarget* **7**, 64649–64664 (2016).
102. Graham, J. A. *et al.* Suppressive Regulatory T Cell Activity Is Potentiated by Glycogen Synthase Kinase 3 β Inhibition. *J. Biol. Chem.* **285**, 32852–32859 (2010).
103. Ding, Y., Shen, S., Lino, A. C., Curotto de Lafaille, M. A. & Lafaille, J. J. Beta-catenin stabilization extends regulatory T cell survival and induces anergy in nonregulatory T cells. *Nat. Med.* **14**, 162–169 (2008).
104. Chae, W.-J. & Bothwell, A. L. M. Spontaneous Intestinal Tumorigenesis in *Apc* (*/Min+*) Mice Requires Altered T Cell Development with IL-17A. *J. Immunol. Res.* **2015**, 860106 (2015).
105. Dennis, K. L. *et al.* T-cell Expression of IL10 Is Essential for Tumor Immune Surveillance in the Small Intestine. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 806–814 (2015).
106. Agüera-González, S. *et al.* Adenomatous Polyposis Coli Defines Treg Differentiation and Anti-inflammatory Function through Microtubule-Mediated NFAT Localization. *Cell Rep.* **21**, 181–194 (2017).

107. Zhou, X. *et al.* Differentiation and Persistence of Memory CD8+ T Cells Depend on T Cell Factor 1. *Immunity* **33**, 229–240 (2010).
108. Zhou, X. & Xue, H.-H. Cutting Edge: Generation of Memory Precursors and Functional Memory CD8+ T Cells Depends on T Cell Factor-1 and Lymphoid Enhancer-Binding Factor-1. *J. Immunol.* **189**, 2722–2726 (2012).
109. Tiemessen, M. M. *et al.* T Cell Factor 1 Represses CD8+ Effector T Cell Formation and Function. *J. Immunol.* **193**, 5480–5487 (2014).
110. Gattinoni, L. *et al.* Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8⁺ memory stem cells. *Nat. Med.* **15**, 808–813 (2009).
111. Gattinoni, L. *et al.* A human memory T cell subset with stem cell–like properties. *Nat. Med.* **17**, 1290–1297 (2011).
112. Whyte, J. L., Smith, A. A. & Helms, J. A. Wnt Signaling and Injury Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* a008078 (2012). doi:10.1101/cshperspect.a008078
113. Gieseck, R. L., Wilson, M. S. & Wynn, T. A. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 62–76 (2018).
114. Foulquier, S. *et al.* WNT Signaling in Cardiac and Vascular Disease. *Pharmacol. Rev.* **70**, 68–141 (2018).
115. Luo, T., Dunphy, P. S., Lina, T. T. & McBride, J. W. Ehrlichia chaffeensis Exploits Canonical and Noncanonical Host Wnt Signaling Pathways To Stimulate Phagocytosis and Promote Intracellular Survival. *Infect. Immun.* **84**, 686–700 (2016).
116. Villaseñor, T. *et al.* Activation of the Wnt Pathway by Mycobacterium tuberculosis: A Wnt–Wnt Situation. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
117. Neumann, J. *et al.* Frizzled1 is a marker of inflammatory macrophages, and its ligand Wnt3a is involved in reprogramming Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *FASEB J.* **24**, 4599–4612 (2010).

118. Yong, X. *et al.* Helicobacter pylori upregulates Nanog and Oct4 via Wnt/ β -catenin signaling pathway to promote cancer stem cell-like properties in human gastric cancer. *Cancer Lett.* **374**, 292–303 (2016).
119. Benamrouz, S. *et al.* Cryptosporidium parvum-induced ileo-caecal adenocarcinoma and Wnt signaling in a mouse model. *Dis. Model. Mech.* **7**, 693–700 (2014).
120. Teo, W. H., Chen, H.-P., Huang, J. C. & Chan, Y.-J. Human cytomegalovirus infection enhances cell proliferation, migration and upregulation of EMT markers in colorectal cancer-derived stem cell-like cells. *Int. J. Oncol.* **51**, 1415–1426 (2017).
121. Pan, J., Tong, S. & Tang, J. LncRNA expression profiles in HBV-transformed human hepatocellular carcinoma cells treated with a novel inhibitor of human La protein. *J. Viral Hepat.* **25**, 391–400 (2018).
122. Rath, G., Jawanjal, P., Salhan, S., Nalliah, M. & Dhawan, I. Clinical Significance of Inactivated Glycogen Synthase Kinase 3β in HPV-Associated Cervical Cancer: Relationship with Wnt/ β -Catenin Pathway Activation. *Am. J. Reprod. Immunol.* **73**, 460–478 (2015).
123. Wu, X. *et al.* A Caspase-Dependent Pathway Is Involved in Wnt/ β -Catenin Signaling Promoted Apoptosis in Bacillus Calmette-Guerin Infected RAW264.7 Macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 5045–5062 (2014).
124. Wang, Q. *et al.* Enhanced Wnt Signalling in Hepatocytes is Associated with Schistosoma japonicum Infection and Contributes to Liver Fibrosis. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
125. Maluquer de Motes, C. & Smith, G. L. Vaccinia virus protein A49 activates Wnt signalling by targetting the E3 ligase β -TrCP. *J. Gen. Virol.* **98**, 3086–3092 (2017).

126. Zvezdaryk, K. J., Combs, J. A., Morris, C. A. & Sullivan, D. E. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by herpesviruses. *World J. Virol.* **5**, 144–154 (2016).
127. Tokunaga, Y. *et al.* Selective inhibitor of Wnt/ β -catenin/CBP signaling ameliorates hepatitis C virus-induced liver fibrosis in mouse model. *Sci. Rep.* **7**, 325 (2017).
128. Ruiz-Riol, M. *et al.* Identification of Interleukin-27 (IL-27)/IL-27 Receptor Subunit Alpha as a Critical Immune Axis for In Vivo HIV Control. *J. Virol.* **91**, (2017).
129. Bansal, K., Trinath, J., Chakravorty, D., Patil, S. A. & Balaji, K. N. Pathogen-specific TLR2 Protein Activation Programs Macrophages to Induce Wnt- β -Catenin Signaling. *J. Biol. Chem.* **286**, 37032–37044 (2011).
130. Swafford, D. & Manicassamy, S. Wnt Signaling in Dendritic Cells: Its Role in Regulation of Immunity and Tolerance. *Discov. Med.* **19**, 303–310 (2015).
131. Pereira Claudia, Schaer Dominik J., Bachli Esther B., Kurrer Michael O. & Schoedon Gabriele. Wnt5A/CaMKII Signaling Contributes to the Inflammatory Response of Macrophages and Is a Target for the Antiinflammatory Action of Activated Protein C and Interleukin-10. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 504–510 (2008).
132. Manoharan, I. *et al.* TLR2-Dependent Activation of β -Catenin Pathway in Dendritic Cells Induces Regulatory Responses and Attenuates Autoimmune Inflammation. *J. Immunol.* **193**, 4203–4213 (2014).
133. Ma, B. & Hottiger, M. O. Crosstalk between Wnt/ β -Catenin and NF- κ B Signaling Pathway during Inflammation. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
134. Tarleton, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 430–434 (2007).

135. Staal, F. J. T., Luis, T. C. & Tiemessen, M. M. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 329 (2015).
136. Houschyar, K. S. *et al.* Role of Wnt signaling during inflammation and sepsis: A review of the literature. *Int. J. Artif. Organs* **41**, 247–253 (2018).
137. Gantner, B. N. *et al.* The Akt1 isoform is required for optimal IFN- β transcription through direct phosphorylation of β -catenin. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 3104–3111 (2012).
138. Yu, C.-H. *et al.* Recombinant Wnt3a and Wnt5a elicit macrophage cytokine production and tolerization to microbial stimulation via Toll-like receptor 4. *Eur. J. Immunol.* **44**, 1480–1490 (2014).
139. Li, Y. *et al.* A Wnt/ β -catenin negative feedback loop represses TLR-triggered inflammatory responses in alveolar epithelial cells. *Mol. Immunol.* **59**, 128–135 (2014).
140. Dijksterhuis, J. P. *et al.* Systematic Mapping of WNT-FZD Protein Interactions Reveals Functional Selectivity by Distinct WNT-FZD Pairs. *J. Biol. Chem.* **290**, 6789–6798 (2015).
141. Burleigh, B. A. & Andrews, N. W. The Mechanisms of Trypanosoma Cruzi Invasion of Mammalian Cells. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 175–200 (1995).
142. Yoshida, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **78**, 87–111 (2006).
143. Kayama, H. *et al.* NFATc1 Mediates Toll-Like Receptor-Independent Innate Immune Responses during Trypanosoma cruzi Infection. *PLOS Pathog.* **5**, e1000514 (2009).
144. Willert, K. & Nusse, R. Wnt Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a007864 (2012).

145. Hong, Y. *et al.* Deletion of LRP5 and LRP6 in dendritic cells enhances antitumor immunity. *Oncoimmunology* **5**, e1115941 (2016).
146. Liang, Y. *et al.* Tumor necrosis factor receptor 2 may promote the proliferation and drug resistance of Karpas299 and L428 lymphoma cells via the AKT and WNT/ β -catenin signaling pathways. *Oncol. Lett.* **15**, 8847–8852 (2018).
147. Fang, D. *et al.* PHOSPHORYLATION OF β -CATENIN BY AKT PROMOTES β -CATENIN TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY. *J. Biol. Chem.* **282**, 11221–11229 (2007).
148. Taurin, S., Sandbo, N., Qin, Y., Browning, D. & Dulin, N. O. Phosphorylation of β -Catenin by Cyclic AMP-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **281**, 9971–9976 (2006).
149. Manning, B. D. & Toker, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **169**, 381–405 (2017).
150. Pourrajab, F., Yazdi, M. B., Zarch, M. B., Zarch, M. B. & Hekmatimoghaddam, S. Cross talk of the first-line defense TLRs with PI3K/Akt pathway, in preconditioning therapeutic approach. *Mol. Cell. Ther.* **3**, 4 (2015).
151. Taylor, S. S. *et al.* PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **1697**, 259–269 (2004).
152. Chang, C. I., Zoghi, B., Liao, J. C. & Kuo, L. The involvement of tyrosine kinases, cyclic AMP/protein kinase A, and p38 mitogen-activated protein kinase in IL-13-mediated arginase I induction in macrophages: its implications in IL-13-inhibited nitric oxide production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **165**, 2134–2141 (2000).
153. Liu, L., Wang, Y., Fan, Y., Li, C.-L. & Chang, Z.-L. IFN-gamma activates cAMP/PKA/CREB signaling pathway in murine peritoneal macrophages. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **24**, 334–342 (2004).

154. Pourrajab, F., Yazdi, M. B., Zarch, M. B., Zarch, M. B. & Hekmatimoghaddam, S. Cross talk of the first-line defense TLRs with PI3K/Akt pathway, in preconditioning therapeutic approach. *Mol. Cell. Ther.* **3**, (2015).
155. Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G. N. & Martin, M. TLR-signaling Networks: An Integration of Adaptor Molecules, Kinases, and Cross-talk. *J. Dent. Res.* (2010). doi:10.1177/0022034510381264
156. Katoh, M. Multi-layered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/ β -catenin signaling activation (Review). *Int. J. Mol. Med.* **42**, 713–725 (2018).
157. Shao, Y. *et al.* Biological functions of macrophage-derived Wnt5a, and its roles in human diseases. *Oncotarget* **7**, 67674–67684 (2016).
158. Corrêa, S. *et al.* Wnt/ β -catenin pathway regulates ABCB1 transcription in chronic myeloid leukemia. *BMC Cancer* **12**, 303 (2012).
159. Lim, J. C. *et al.* Activation of β -catenin signalling by GSK-3 inhibition increases p-glycoprotein expression in brain endothelial cells. *J. Neurochem.* **106**, 1855–1865 (2008).
160. Dandekar, S. *et al.* Wnt inhibition leads to improved chemosensitivity in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **167**, 87–99 (2014).
161. Jardé, T. *et al.* In vivo and in vitro models for the therapeutic targeting of Wnt signaling using a Tet-O Δ N89 β -catenin system. *Oncogene* **32**, 883–893 (2013).
162. Abais, J. M., Xia, M., Zhang, Y., Boini, K. M. & Li, P.-L. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? *Antioxid. Redox Signal.* **22**, 1111–1129 (2015).
163. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 57–63 (2009).

164. Kaplan, C. *et al.* Th1 and Th2 cytokines regulate proteoglycan-specific autoantibody isotypes and arthritis. *Arthritis Res.* **4**, 54–58 (2002).
165. Ribeiro, A. L. P. *et al.* Parasympathetic dysautonomia precedes left ventricular systolic dysfunction in Chagas disease. *Am. Heart J.* **141**, 260–265 (2001).
166. Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* **1**, 92–100 (2001).
167. Motrán, C. C., Cerbán, F. M., Rivarola, W., Iosa, D. & Vottero de Cima, E. Trypanosoma cruzi: immune response and functional heart damage induced in mice by the main linear B-cell epitope of parasite ribosomal P proteins. *Exp. Parasitol.* **88**, 223–230 (1998).
168. Silva-García, O., Valdez-Alarcón, J. J. & Baizabal-Aguirre, V. M. The Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway Controls the Inflammatory Response in Infections Caused by Pathogenic Bacteria. *Mediators of Inflammation* (2014). doi:10.1155/2014/310183
169. Makin, L. & Gluenz, E. cAMP signalling in trypanosomatids: role in pathogenesis and as a drug target. *Trends Parasitol.* **31**, 373–379 (2015).
170. Bao, Y., Weiss, L. M., Braunstein, V. L. & Huang, H. Role of Protein Kinase A in Trypanosoma cruzi. *Infect. Immun.* **76**, 4757–4763 (2008).
171. Hino, S., Tanji, C., Nakayama, K. I. & Kikuchi, A. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9063–9072 (2005).
172. Baizabal-Aguirre, V. M. Editorial: Cross-Talk Mechanisms of Wnt/Beta-Catenin Signaling Components with TLR-Activated Signaling Molecules in the Inflammatory Response. *Front. Immunol.* **8**, (2017).

173. Fu, C. *et al.* β -Catenin in dendritic cells exerts opposite functions in cross-priming and maintenance of CD8⁺ T cells through regulation of IL-10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 2823–2828 (2015).
174. Bai, M. *et al.* The crosstalk between β -catenin signaling and type I, type II and type III interferons in lung cancer cells. *Am. J. Transl. Res.* **9**, 2788–2797 (2017).
175. Vitelli-Avelar, D. M. *et al.* Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4⁺CD25^{high} T cells balancing activated CD8⁺ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin. Exp. Immunol.* **145**, 81–92 (2006).
176. Ferreira, R. R. *et al.* TGF- β Polymorphisms Are a Risk Factor for Chagas Disease. *Disease Markers* (2018). doi:10.1155/2018/4579198
177. Silva, J. S., Twardzik, D. R. & Reed, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J. Exp. Med.* **174**, 539–545 (1991).
178. Waghbi, M. C. *et al.* Increased *Trypanosoma cruzi* Invasion and Heart Fibrosis Associated with High Transforming Growth Factor β Levels in Mice Deficient in α 2-Macroglobulin. *Infect. Immun.* **70**, 5115–5123 (2002).
179. Reed, S. G. *et al.* IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **153**, 3135–3140 (1994).
180. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* **175**, 169–174 (1992).
181. Thaker, A. I. *et al.* IDO1 Metabolites Activate β -catenin Signaling to Promote Cancer Cell Proliferation and Colon Tumorigenesis in Mice. *Gastroenterology* **145**, 416-425.e4 (2013).

182. Suryawanshi, A. & Manicassamy, S. Tumors induce immune tolerance through activation of β -catenin/TCF4 signaling in dendritic cells: A novel therapeutic target for cancer immunotherapy. *OncoImmunology* **4**, e1052932 (2015).
183. Soichot, M. *et al.* Identification of a Variable Number of Tandem Repeats Polymorphism and Characterization of LEF-1 Response Elements in the Promoter of the IDO1 Gene. *PLOS ONE* **6**, e25470 (2011).
184. ROBINSON, C. M., HALE, P. T. & CARLIN, J. M. The Role of IFN- γ and TNF- α -Responsive Regulatory Elements in the Synergistic Induction of Indoleamine Dioxygenase. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **25**, 20–30 (2005).
185. Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. Regulatory T Cells, Transforming Growth Factor- β , and Immune Suppression. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **4**, 271–276 (2007).
186. Oldenhove, G. *et al.* Decrease of Foxp3⁺ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* **31**, 772 (2009).
187. van Loosdregt, J. *et al.* Canonical Wnt Signaling Negatively Modulates Regulatory T Cell Function. *Immunity* **39**, 298–310 (2013).
188. Dai, W. *et al.* Blockade of Wnt/ β -Catenin Pathway Aggravated Silica-Induced Lung Inflammation through Tregs Regulation on Th Immune Responses. *Mediators of Inflammation* (2016). doi:10.1155/2016/6235614
189. Cheng, J. H. *et al.* Wnt antagonism inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **294**, G39–G49 (2008).
190. He, W. *et al.* Exogenously administered secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) reduces fibrosis and improves cardiac function in a rat model of myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 21110–21115 (2010).

191. Trenszt, F., Haroun, S., Cloutier, A., Richter, M. V. & Grenier, G. A muscle resident cell population promotes fibrosis in hindlimb skeletal muscles of mdx mice through the Wnt canonical pathway. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **299**, C939–C947 (2010).
192. Wei, J. *et al.* Canonical Wnt signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipodystrophy: A novel mouse model for scleroderma? *Arthritis Rheum.* **63**, 1707–1717 (2011).
193. He, W. *et al.* Wnt/ β -Catenin Signaling Promotes Renal Interstitial Fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 765–776 (2009).
194. Königshoff, M. *et al.* Functional Wnt Signaling Is Increased in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLOS ONE* **3**, e2142 (2008).
195. Feng, Y. *et al.* Wnt/ β -Catenin–Promoted Macrophage Alternative Activation Contributes to Kidney Fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **29**, 182–193 (2018).
196. Corral, R. S., Guerrero, N. A., Grajal, H. C., Gironès, N. & Fresno, M. Trypanosoma cruzi Infection and Endothelin-1 Cooperatively Activate Pathogenic Inflammatory Pathways in Cardiomyocytes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2034 (2013).