



Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

**Mediadores intracelulares involucrados en la polarización del
macrófago durante la infección con *Trypanosoma cruzi*.
Implicancias en la sobrevivencia del parásito**

Lic. Jorge David Rojas Márquez

Departamento de Bioquímica Clínica, Centro de Investigaciones en Bioquímica
Clínica e Inmunología - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y
Técnicas (CIBICI - CONICET), de la Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Nacional de Córdoba
Argentina

2018

DIRECTOR

Dr. Fabio Cerban

COMISIÓN ASESORA DE TESIS

Dra. Laura Cervi

Dra. Alicia Degano

Dra. Teresa Scimonelli

EVALUADOR EXTERNO

Dr. Oscar Bottasso

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica Clínica, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIBICI - CONICET), de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Córdoba, con el apoyo de las becas otorgadas por CONICET.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo de subsidios otorgados por la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT - UNC), CONICET, el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba (MinCyT) y el Fondo Nacional para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT).

A la gran patria Argentina

AGRADECIMIENTOS

Finalmente, ha llegado el momento de mencionar y agradecer a todos los actores que participaron de esta obra científica; a todos los que estuvieron directamente involucrados como a los que estuvieron detrás del telón, mis más profundos agradecimientos. Este espacio es para que sepan que todo lo que viene a continuación, no pudo haberse logrado sin ellos.

Agradezco especialmente a Fabio, por las innumerables cuotas de confianza que me diste desde el momento en el que llegué a tu grupo de trabajo, por tu completa predisposición y, fundamentalmente, por el tiempo que dedicaste a mi superación profesional, gracias a eso pude redactar estas líneas.

Cinthia, fuiste la primera persona que conocí al llegar al laboratorio. Desde ese día me di cuenta del gran motor, incansable, que tenés por tu pasión, la ciencia. Mi formación científica te la debo en gran parte a vos, una gran investigadora, madre y mujer. Creo que no me equivoco al afirmar que hemos pasado toda clase de momentos durante estos años. Quiero que tengas presente que siempre voy a recordar la enorme paciencia y la dedicación con la que trabajaste conmigo.

Al evaluador externo, Dr. Oscar Bottasso, y a los miembros del tribunal de tesis por todo su acompañamiento, por sus ideas, consejos y sugerencias, Dra. Alicia Degano, Dra. Laura Cervi y Dra. Teresa Scimonelli.

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica Clínica de esta facultad, en quienes he encontrado una cariñosa y especial relación laboral y personal. Conforman un grupo de profesionales de excelentísima calidad y experiencia.

Al personal técnico y administrativo de esta facultad, los cuales tienen una calidad humana incomparable. Agradezco especialmente a Alejandra Romero, Fabricio Navarro, Gabriela Furlan, Pilar Crespo, Laura Gatica, Adri Berretta, Victoria Blanco y Betina Aldrecht.

Al ala de inmunología, un grupo del cual siempre voy a tener los mejores recuerdos, unas cuántas páginas llevan la impronta de varios miembros, profesionales con las vocaciones más férreas y admirables que se pueda llegar a conocer.

A todos mis compañeros y excompañeros del lab 103: Eliana Baigorri, Melisa Gorosito, Jimena Tosello, Alfredo Arocena, Luisina Onofrio, Nicolas Ponce, Laura Almada, Carolina Abrate, Santiago Boccardo, Constansa Rodriguez, Sabrina Bossio, Cristian Beccaria, Constansa Insfran y a la última y más joven adquisición de nuestro grupo, Belu Brugo, un gran cariño. Gracias

por todos los vínculos que construimos a lo largo de este tiempo, los voy a llevar en mi corazón por el resto de mi vida. No saben chicos lo mucho que ha impactado cada uno de ustedes en mí.

No por último menos importantes. Gracias a todos los amigos que me dejaron entrar en sus vidas y, todavía más, por haber decidido quedarse en la mía. Gracias especialmente a mi compañera de grupo, Yamile, a quien le debo no solo parte de esta tesis, sino también tantas risas y experiencias, te sigo y te admiro. Gracias mi querida Volpi, mi querida Lili Sanmarco, Facu Fiocca, Ignacia, Nati Siempredura y Fernanda Suarez por todas las horas de “vida misma” que hemos tenido, me han hecho ver perspectivas realmente geniales de la misma. Me han inspirado y no solo científicamente, sino también personalmente. Cada uno de ustedes es para mí un ser humano especial, para mí vida y para el mundo. Gracias por todos los días, por los consejos, enseñanzas, experiencias, críticas y estímulos, todos ellos hoy hacen parte de la persona que soy. Espero tengamos muchos más años para vivir juntos.

A mis amigos de la vida. Mi gran amigo Diego, una de las principales razones por las que vine a Córdoba, por las que sigo en ciencia y por el cual tengo unas de las admiraciones más profundas. Por tu tiempo, tu fidelidad, tus palabras y por todos estos años, gracias. A Canale, un amigo para el resto de la vida, un ser especial con el que he compartido cosas particularmente memorables. Tu mirada, tu sensibilidad y la nobleza que tienes para con el mundo es algo que agradezco haber conocido. A mi querido “Darling”, un ser venido desde el más allá, que me compartió parte de su vida, de sus gustos, de su preciosísima música y, sobre todo, de su tiempo. A Sofi, la primera amiga en Córdoba, qué momentos, no? Te llevo en el corazón. A Nubia “la turca” Yandar, amiga y paisana colombiana, una mujer admirable, gracias por tantísimas alegrías.

A mi familia. A mis queridos padres, Ruth y Jorge, uno de los ejes de mi vida, son mi inspiración, tanta paciencia, tanto tiempo, tanta vida compartida. A mis queridas hermanitas, Nancy, Zaida y Sonia, gracias por todo su amor, por estar y por haberme permitido conocer a seres tan especiales como mis sobrinos. A todos, gracias.

A Jime. Al corazón de mi vida. A ella y todo lo que emana de su existencia. Porque todo vuelve a tener significado cuando llegas a casa. Gracias por elegirme todos los días. A vos todo mi amor, toda mi vida, toda mi esencia, todas mis mañanas, toda mi soledad, todos mis sueños, todos mis fracasos, todos mis dolores, mis frustraciones, mis errores y mis defectos. Todo y cada parte que conozco –y que no-, de mí mismo, te lo doy a vos. Gracias.

ÍNDICE

Abreviaturas	I
Resumen	IV
Summary	VII
Capítulo 1: Introducción	1
1.1 La enfermedad de Chagas	2
1.2 El sistema inmune y el <i>T. cruzi</i>	6
1.2.1 La invasión	8
1.2.2 El escape	11
1.2.3 Polarizando al macrófago	12
1.3 En el interior del macrófago	13
1.4 La vía de mTOR y el <i>T. cruzi</i>	21
Capítulo 2: Hipótesis	24
Capítulo 3: Objetivos	26
Capítulo 4: Materiales y métodos	28
4.1 Modelo animal	29
4.2 Cultivo y mantenimiento de <i>T. cruzi</i>	29
4.3 Macrófagos peritoneales y macrófagos derivados de medula ósea	30
4.4 Insumos y reactivos	31
4.5 Modelos de inhibición	32
4.6 Análisis por citometría de flujo	33
4.7 Determinación de citoquinas	35
4.8 Western Blot	35
4.9 Inmunofluorescencia	37

4.10	Determinación de óxido nítrico	37
4.11	Determinación de urea	38
4.12	Análisis estadístico	38
Capítulo 5: Resultados		39
5.1	El <i>T. cruzi</i> y la vía de señalización de mTOR en el macrófago	40
5.1.1	La quinasa mTOR y su participación durante los eventos de replicación del <i>T. cruzi</i>	40
5.1.2	La inhibición de mTOR y la sobrevivencia del <i>T. cruzi</i>	42
5.1.3	mTOR y el balance iNOS/Arginasa durante la infección con <i>T. cruzi</i>	47
5.1.4	mTOR y el balance IL-10/IL-12 durante la infección con <i>T. cruzi</i>	49
5.2	mTOR y los mecanismos inflamatorios en el macrófago durante la infección con <i>T. cruzi</i>	52
5.2.1	mTOR y la activación inflamatoria del macrófago durante la infección con <i>T. cruzi</i>	52
5.2.2	El macrófago y los mecanismos que participan del fenotipo M1...	57
5.3	mTOR y el inflamasoma durante la infección con <i>T. cruzi</i>	65
5.3.1	El inflamasoma como mecanismo inflamatorio	65
5.3.2	La inhibición de mTOR y el inflamasoma	67
Capítulo 6: Discusión		75
Capítulo 7: Conclusiones		86
Anexo		88
Bibliografía		90

ABREVIATURAS

ArgI	Arginasa I
ATP	Adenosina trifosfato
DDMO	Células dendríticas derivadas de médula ósea
MDMO	Macrófagos derivados de médula ósea
CASP 1/11	Caspasa 1/11
CD	“Clusters” de diferenciación
DPI	Cloruro de difenileneidonio
IDO	Indoleamina 2,3 dioxigenasa
IL-	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
ISPF	α-isonitrosopropiofenona
LCM	Medio condicionado de L929
LC3	Proteína asociada a microtúbulo de cadena liviana 3
LPS	Lipopolisacarido
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
M-CSF	Factor estimulante de colonia de monocitos
mTOR	Proteína de mamífero diana de rapamicina
mTORC1/2	Complejo mTOR 1 – Complejo mTOR 2
MP	Macrófagos peritoneales
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NK	Células asesinas naturales
NLR	Receptores tipo NOD
NOHA	Ng-hidroxi-L-arginina
ON	Óxido nítrico
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PI3K	Fosfoinositol-3 quinasa
PKA	Proteína quinasa A
P70S6K	Proteína quinasa de subunidad S6
p.i.	Posinfección
RFc	Receptor de fracción cristalizable de inmunoglobulina
RHEB	Proteína RAS enriquecida en cerebro
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RRP	Receptores de reconocimiento de patrón
SBF	Suero bovino fetal
TC	Transialidasa de tripomastigote
TcVP	Vacuola parasitófora de tripomastigote
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
Th	Linfocito T cooperador
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
Th	Linfocito T “helper”
TK	Tirosina quinasa
TKR	Receptor de tirosina quinasa
TLR	Receptor tipo toll

TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TSC 1/2	Proteína de complejo de esclerosis tuberosa 1/2
VP	Vacuola parasitófora
YM1	Chil3 chitinase-like 3
4EBP1	Proteína 1 de unión a factor regulador de la iniciación de la traducción eucariótica

RESUMEN

El macrófago representa a una clase de célula de la inmunidad innata cuya actividad fagocítica y antimicrobiana, le permite internalizar a las formas tripomastigotes del *Trypanosoma cruzi* para luego digerirlas en su interior. Sin embargo, ha sido ampliamente estudiada la habilidad que tiene este parásito para evadir los sistemas microbicidas del macrófago y transformarlo en un nicho ideal para su replicación. Los eventos intracelulares involucrados en la modulación del fenotipo de esta célula frente al *T. cruzi*, son ejercidos en gran parte por la actividad de la vía de mTOR, una vía de señalización encargada del metabolismo y homeostasis de las células en general, y que particularmente en el macrófago participa en la activación de sus funciones inmunológicas. En el presente trabajo se abordaron los aspectos relacionados a la señalización intracelular y a las funciones efectoras de macrófagos murinos, relevantes tanto para la sobrevivencia del parásito, así como para su eliminación.

Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que la sobrevivencia y replicación del *T. cruzi* en macrófagos peritoneales y macrófagos derivados de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6, dependen de eventos importantes como la producción de IL-10, la activación de la enzima arginasa y la participación de la vía de mTOR. Sin embargo, cuando se llevó a cabo la inhibición de dicha vía de señalización, se redujo significativamente la replicación intracelular del parásito al tiempo que se elevó significativamente la producción de IL-12. Sorprendentemente, en estos experimentos la expresión de la enzima iNOS se redujo significativamente, así como la producción de óxido nítrico (ON). Se observó además un descenso en la expresión de la enzima arginasa, así como también en la producción de IL-10. Es decir que cuando mTOR se encontraba inhibido, los macrófagos se volvieron más inflamatorios.

Dado que el efecto microbicida provocado por la inhibición de mTOR ocurre a través de mecanismos independientes de la expresión y actividad de la enzima iNOS, se realizó un estudio

sobre el estado de activación de otros mecanismos inflamatorios disponibles en el macrófago, que pudieran estar participando en la disminución de la carga parasitaria observada durante la inhibición de esta vía. El presente estudio pudo demostrar que el control de la replicación del parásito durante la inhibición de mTOR, ocurrió a través de mecanismos independientes a la actividad de la enzima IDO y de la producción de ROS citoplasmáticos, al tiempo que se demostró la activación del inflamasoma NLRP3 junto con la producción de ROS mitocondriales.

En conjunto, estos resultados destacan la gran plasticidad del macrófago como célula efectora del sistema inmune, su importancia durante la infección con el *T. cruzi* y la utilidad que se desprende de este conocimiento para el planteamiento de nuevas estrategias terapéuticas.

SUMMARY

Macrophages are a cell type of innate immunity and its phagocytic and antimicrobial activities allow them to internalize trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) to digest them. Macrophage infection by the *T. cruzi* is a key event for its dissemination, since the ability of this parasite to evade its microbicidal systems to transform this cell into a niche ideal for its reproduction. The intracellular mechanisms involved in modulating macrophage phenotype are promoted by mTOR pathway activity, not only responsible for macrophage metabolism and homeostasis, but also for several immune functions. In the present work were addressed the aspects related to the intracellular signaling and effector functions of murine macrophages, relevant both for the survival of the parasite as well as for its elimination.

The results obtained in this thesis showed that the survival and replication of *T. cruzi* in peritoneal macrophages and macrophages derived from bone marrow from BALB/c and C57BL/6 mice, depends on the important events such as the IL-10 production, arginase enzyme activation and mTOR pathway participation. However, when the inhibition of said signaling pathway was carried out, the intracellular replication of parasite was significantly reduced while IL-12 production was significantly increased. Surprisingly in these experiments the iNOS enzyme expression was significantly reduced, as well as nitric oxide production (NO). A diminished arginase enzyme expression was also observed, as well as in IL-10 production. That is, when mTOR was inhibited, macrophages became more inflammatory.

Given that the microbicidal effect caused by the inhibition of mTOR occurs through mechanisms independent of iNOS expression and activity, a study was carried out on the activation status of other inflammatory mechanisms available in macrophage, which could be participating in parasitic load decrease observed during inhibition of this pathway.

Among mechanisms that were not involved in the effect on the parasitic burden, we can mention the iNOS and nitric oxide production, the IDO and kinurenins production and the cytoplasmic ROS production. On the other hand, the results of this screening shows that inhibition of mTOR pathway promoted the reduction of parasite burden through the activation of NLRP3 inflammasome and mitochondrial ROS production.

Together, these results highlight the great plasticity of the macrophage as an effector cell of immune system, its importance during infection with *T. cruzi* and the usefulness that emerges from this knowledge for the approach of new therapeutic strategies.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La enfermedad de Chagas

Conocida también como tripanosomiasis americana, la enfermedad de Chagas es un desorden multisistémico, causado por la infección con el parásito protozoario *T. cruzi*, y se estima que aproximadamente 8 millones de individuos están afectados alrededor del mundo (1-4). Aunque esta enfermedad es endémica de 21 países de América Latina, desde el norte de México hasta el sur de Argentina y Chile, los fenómenos migratorios ampliaron los límites de este mal, encontrándose casos en España, EE.UU, Australia, Japón, entre otros países (Figura 1) (3, 5, 6).



Figura 1. Países endémicos y donde se encuentra presente la tripanosomiasis americana.

Adaptado de: <https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/>

Dado que alrededor del 20-30% de los individuos infectados pueden desarrollar cardiomiopatía, megasíndrome digestivo o ambos, esta enfermedad constituye un importante problema para la salud pública, no sólo por su prevalencia sino también por los altos costos para su tratamiento y prevención (7, 8). En Argentina hay de 1.5 a 2 millones de personas infectadas, de las cuales 300000 desarrollarán afecciones cardíacas de distinto grado, por lo general en las poblaciones localizadas en zonas rurales o suburbanas de la región. La provincia de Córdoba se encuentra en alto riesgo de transmisión vectorial, dado que esta vía de contagio ha reemergido por aumento de infestación domiciliar de los vectores, según el Ministerio de Salud de la Nación (2011-2015, P. N. d. C. Res. 867/2012. Boletín Oficial - 2012). Actualmente, la enfermedad de Chagas es considerada por la Organización Mundial de la Salud como una de las 15 enfermedades tropicales olvidadas o desatendidas (1, 9).

La tripanosomiasis se puede dividir en dos etapas clínicas: una aguda y otra crónica. La etapa aguda se presenta entre los 7-13 días luego de la infección, pudiendo extenderse por varias semanas con síntomas como fiebre, diarrea, vómitos, inflamación de nódulos, conjuntivitis, adenopatías, esplenomegalia, entre otros (10, 11). En esta etapa se puede encontrar un elevado número de tripomastigotes en sangre, así como también elevados niveles de citoquinas inflamatorias y activación de células de la inmunidad adaptativa. Por otro lado, el 70% de las personas infectadas no desarrollan síntomas de la enfermedad durante años o décadas, constituyendo la etapa crónica de la afección (forma indeterminada). En el otro 30% de personas afectadas, los niveles de parásitos no pueden detectarse en sangre sino más bien reubicados predominantemente en tejidos específicos. De esta forma, la enfermedad puede evolucionar hacia patologías cardíacas (miocarditis dilatada), digestivas (megaesófago y megacolon) o

cardiodigestivas. Frecuentemente las afecciones cardíacas son las que causan el fallo congestivo de corazón, y por tanto constituyen la causa más común de muerte en los pacientes (12).

La enfermedad de Chagas tiene varias vías de transmisión entre las cuales se encuentran la transmisión vertical (de madre a hijo), la vía oral (ingestión de bebida o comida contaminada), a través de transfusiones sanguíneas o trasplante de órganos (inoculación accidental dentro de laboratorios) y la vía vectorial, en la cual participan insectos hemípteros de la familia *Triatominae*, conocidos popularmente como “vinchucas”. Esta última vía, además de ser la principal forma de transmisión de la enfermedad, forma parte del ciclo natural del parásito *T. cruzi* (Figura 2), el cual presenta un ciclo complejo entre los hospedadores insectos y los hospedadores vertebrados (6).

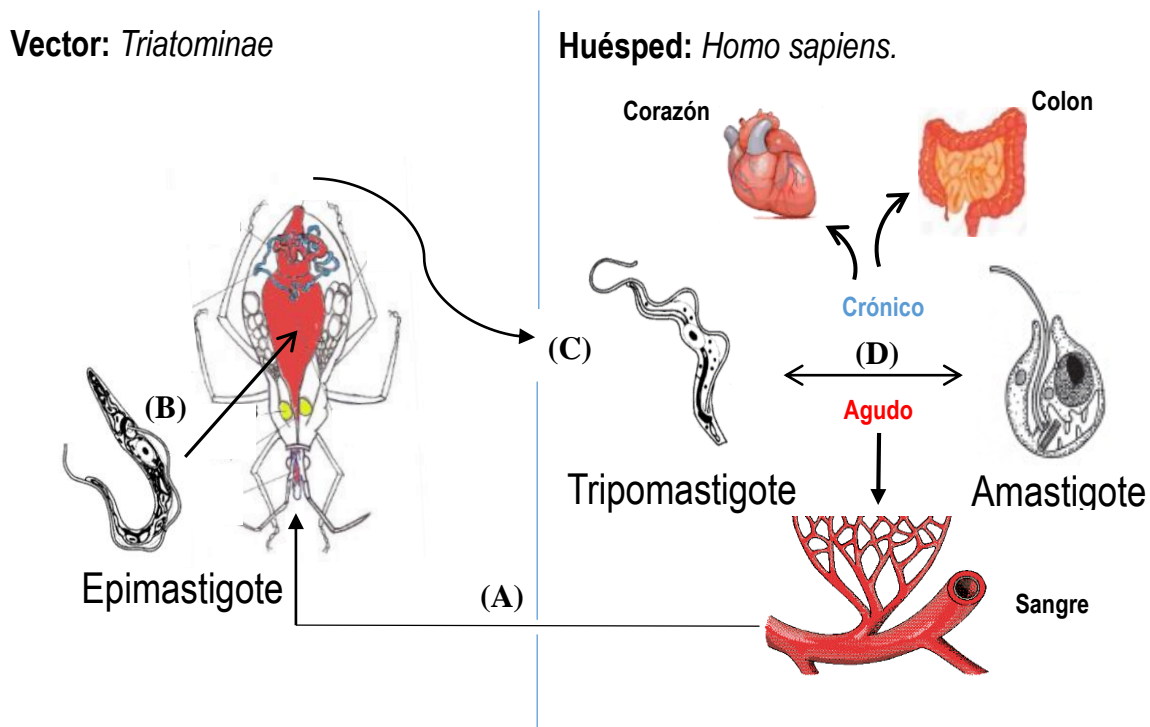


Figura 2. Ciclo vital del parásito *T. cruzi*. (A) El insecto extrae de la sangre de los vertebrados infectados las formas **tripomastigotes** sanguíneas que se convertirán en formas **epimastigotes** en el intestino del triatomo, multiplicándose por división binaria. (B) Los epimastigotes viajan a través del intestino del insecto, al tiempo que se diferencian en **tripomastigotes metacíclicos**, los cuales serán eliminados junto con las heces. (C) Las formas infectivas entrarán de nuevo en el hospedador vertebrado a través de las mucosas o por la picadura del insecto. (D) Los tripomastigotes invaden las células del hospedador, en el interior de las cuales se transforman en **amastigotes**, que se volverán a multiplicar y transformarse en tripomastigotes que invadirán nuevamente a otras células, diseminándose a través del torrente sanguíneo.

El parásito del *T. cruzi* involuciona en 3 formas fenotípicamente distintas, altamente adaptadas a su microambiente: el epimastigote, el tripomastigote y el amastigote, que alternan entre el huésped vertebrado y el insecto triatomino. Los epimastigotes se diferencian y replican en el lumen del intestino proximal del insecto vector. A medida que se dirigen hacia el intestino distal, los epimastigotes comienzan a transformarse en tripomastigotes metacíclicos (la forma infecciosa en el hospedador vertebrado) y se alojan junto a las heces en la ampolla rectal del insecto. Teniendo presente que los triatominos son insectos hematófagos obligados, cuando este perfora la piel del hospedador para alimentarse de su sangre defeca en el mismo lugar de la picadura al tiempo que deposita también los tripomastigotes metacíclicos. El parásito, al ingresar al torrente sanguíneo de su hospedador, invade inmediatamente las células nucleadas de su hospedador, así como también las células de su sistema fagocítico mononuclear. Una vez dentro de la célula fagocítica, el tripomastigote pierde el flagelo y se diferencia en amastigote (la forma replicativa intracelular). Los amastigotes se replican en el interior de la célula por fisión binaria y, después de varios ciclos de división, se diferencian a tripomastigotes sanguíneos circulantes. Esta forma del parásito lisa a la célula contenedora para infectar más células vecinas, diseminarse por sangre e infectar otros tejidos más susceptibles como las fibras musculares estriadas/lisas y células nerviosas. El ciclo del parásito se completa cuando los tripomastigotes sanguíneos son succionados por otra vinchuca que necesite alimentarse. Cuando los tripomastigotes sanguíneos alcanzan el estómago, comienzan a transformarse nuevamente en epimastigotes (13, 14).

1.2 El sistema inmune y el *T. cruzi*

Una vez que el parásito es detectado por el sistema inmune de su hospedador, el control de la infección se lleva a cabo a través de complejas interacciones entre componentes celulares y humorales de la respuesta inmune innata y adaptativa. Al inicio de la fase aguda de la infección, los tripomastigotes sanguíneos son reconocidos a través de los receptores de reconocimiento de patrón (RRP), expresados por varias células del sistema inmune que se unen a la membrana del *T. cruzi* y median su endocitosis.

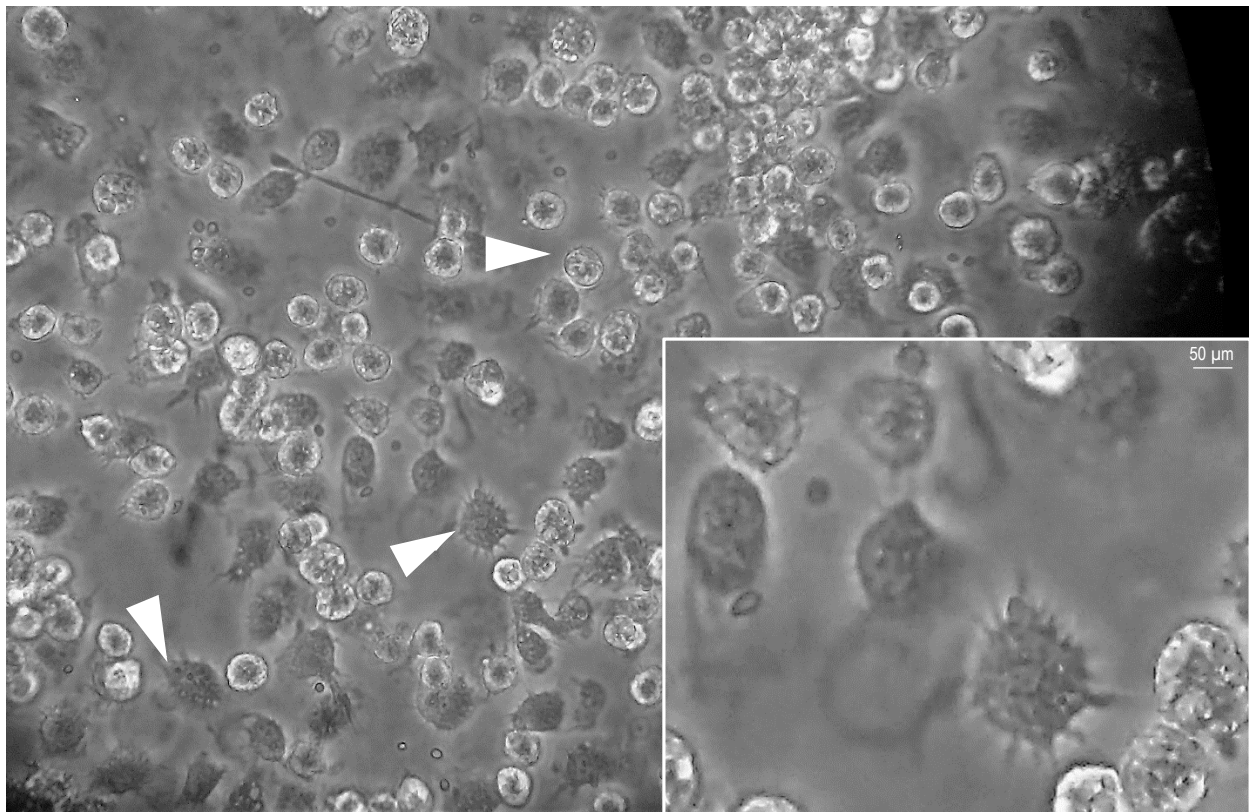


Figura 3. Macrófagos derivados de médula ósea. Macrófagos obtenidos a partir de la médula ósea de ratones C57BL/6 al día 6 de diferenciación, observados en microscopio óptico (40X). La flecha blanca señala a un macrófago con varias extensiones de su membrana o seudópodos. Este tipo de microestructura celular característica, le permite a estas células interactuar con su microambiente, atrapando diferentes tipos de cuerpos celulares (como células apoptóticas), y en escenarios infecciosos, fagocitando distintas clases de patógenos.

Junto con los RRP, componentes de la inmunidad innata, como el complemento y proteínas de fase aguda (proteína C reactiva, principalmente), son los primeros en desencadenar la señalización humoral y celular contra el parásito. Las primeras células efectoras que aparecen para contener la infección son los macrófagos y las células dendríticas que expresan receptores TLRs, claves para el montaje de la respuesta contra *T. cruzi* (15). A través de estos receptores, los fagocitos inducen la producción de moléculas microbicidas como el ON y derivados, además de acompañar la señalización a través de citoquinas inflamatorias como IL-12 y TNF α . Estas citoquinas activan la producción de IFN γ por parte de las células NK al tiempo que se induce la respuesta Th1 (16). Mientras el sistema inmune prepara una respuesta adaptativa efectora, la primera línea de células que son foco para la invasión por parte del *T. cruzi*, son los macrófagos, una célula de origen mieloide perteneciente al denominado sistema fagocítico mononuclear (Figura 3) (17-21). Este tipo de fagocito se caracteriza por ser una célula remarcablemente agresiva en escenarios infecciosos, donde la inflamación y, por tanto, la producción de diferentes moléculas tóxicas, son necesarias para contener la infección. En una etapa más avanzada de la infección, el macrófago reprograma su fenotipo inflamatorio hacia uno alternativo, evento clave para evitar una injuria sobre el tejido a causa de la inflamación, y asimismo responsable de favorecer la replicación intracelular del parásito (22-24). Como se mencionó previamente, los macrófagos infectados secretan IL12, TNF α e IL-6 (25, 26), las cuales actúan sinérgicamente induciendo la expresión de la enzima iNOS, y la consecuente producción de ON. El efecto de este último termina en la destrucción intracelular de los parásitos mediante la modificación química directa de residuos de cisteína de las proteínas o por unión a metaloproteínas importantes en procesos metabólicos (27-33).

1.2.1 La invasión

La interacción entre el *T. cruzi* y el macrófago (Figura 4) ocurre a través de dos etapas diferentes: la adhesión (reconocimiento y señalización intracelular) y la internalización (fagocitosis) con la consecuente formación de la TcPV (vacuola parasitófora de *T. cruzi*) (19, 34-38). Para llevar a cabo el reconocimiento, y la consecuente señalización de las formas tripomastigotes como agentes invasores, el macrófago está equipado con las proteínas receptoras de superficie celular o PRR, que le permiten reconocer o discriminar moléculas características de cada clase de patógeno denominadas PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) (39, 40).

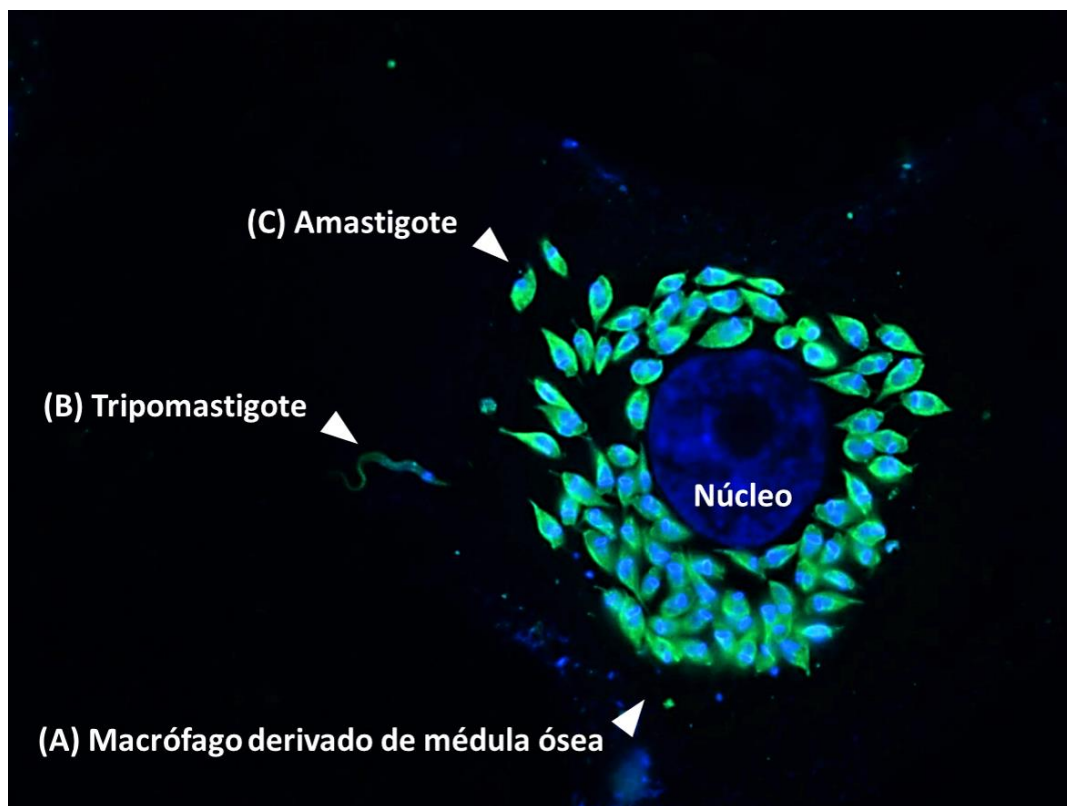


Figura 4. Macrófago derivado de médula ósea siendo infectado por el parásito del *T. cruzi*. (A) Macrófago obtenido a partir de la médula ósea de ratones C57BL/6 al día 6 de diferenciación en medio condicionado, y luego infectado con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos). Se observan los núcleos (azul) teñidos con DAPI, y los parásitos (verde) incubados con un pool de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas y un anticuerpo secundario anti IgGh conjugado con FITC, observados en microscopio de fluorescencia (63X). Las flechas blancas señalan la forma (B) tripomastigote, penetrando a través de la membrana plasmática del macrófago, y la forma (C) amastigote, multiplicándose en su interior.

Los RRP son un grupo de receptores cuya especificidad esta genéticamente predeterminada, y se encuentran altamente conservados entre diferentes organismos. En el macrófago se pueden identificar varios de estos receptores, como los receptores de fracción cristalizable de inmunoglobulina RFcγIII (CD16: IgG1 e IgG3), receptores de complemento (CR1, CR3, CR4), receptores basurero (CD36), receptor de manosa (CD206) y otros receptores de componentes de matriz extracelular (19). En la infección con el *T. cruzi*, el macrófago expresa una variedad de receptores de superficie celular o intracelulares denominados TLR, cuya función es la de reconocer y anclar al parásito a su superficie. Uno de los ejemplos más reconocidos es la interacción entre el receptor TLR2 con las formas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) generadas por el parásito, que inducen una respuesta inflamatoria con producción de IL-12 y TNFα (41, 42). Por otro lado, los PAMPs son esenciales para la patogenicidad y supervivencia de los diferentes microorganismos dentro del huésped, y aunque muchas de ellas están expresadas en la superficie del microorganismo en cuestión, otras son secretadas al microambiente. Para el caso del *T. cruzi*, entre los PAMPs reconocidos por el macrófago podemos encontrar varios tipos de mucinas, transialidasas y glicoproteínas como las formas gp82 y gp85, las cuales cumplen distintas funciones a lo largo de su ciclo de vida (40, 43-46). Una de las moléculas más características es la cruzipaína (Cz), una cisteína-proteasa expresada en todas las formas de involución del parásito (47-49), que participa en el proceso de internalización del tripomastigote y en el desarrollo de los amastigotes intracelulares. Otra molécula importante de la que dispone el parásito para invadir el citoplasma del fagocito es la transialidasa de tripomastigote (TC), una enzima que transfiere ácido siálico a diferentes moléculas de superficie del parásito, promoviendo el anclaje de éstas a diferentes receptores de la célula huésped antes de la invasión (50).

Una vez que el macrófago ha reconocido al tripomastigote y éste se ha adherido a su superficie, ambos coordinan la modulación de diferentes cascadas intracelulares que confluyen en la activación de la fagocitosis (51, 52).

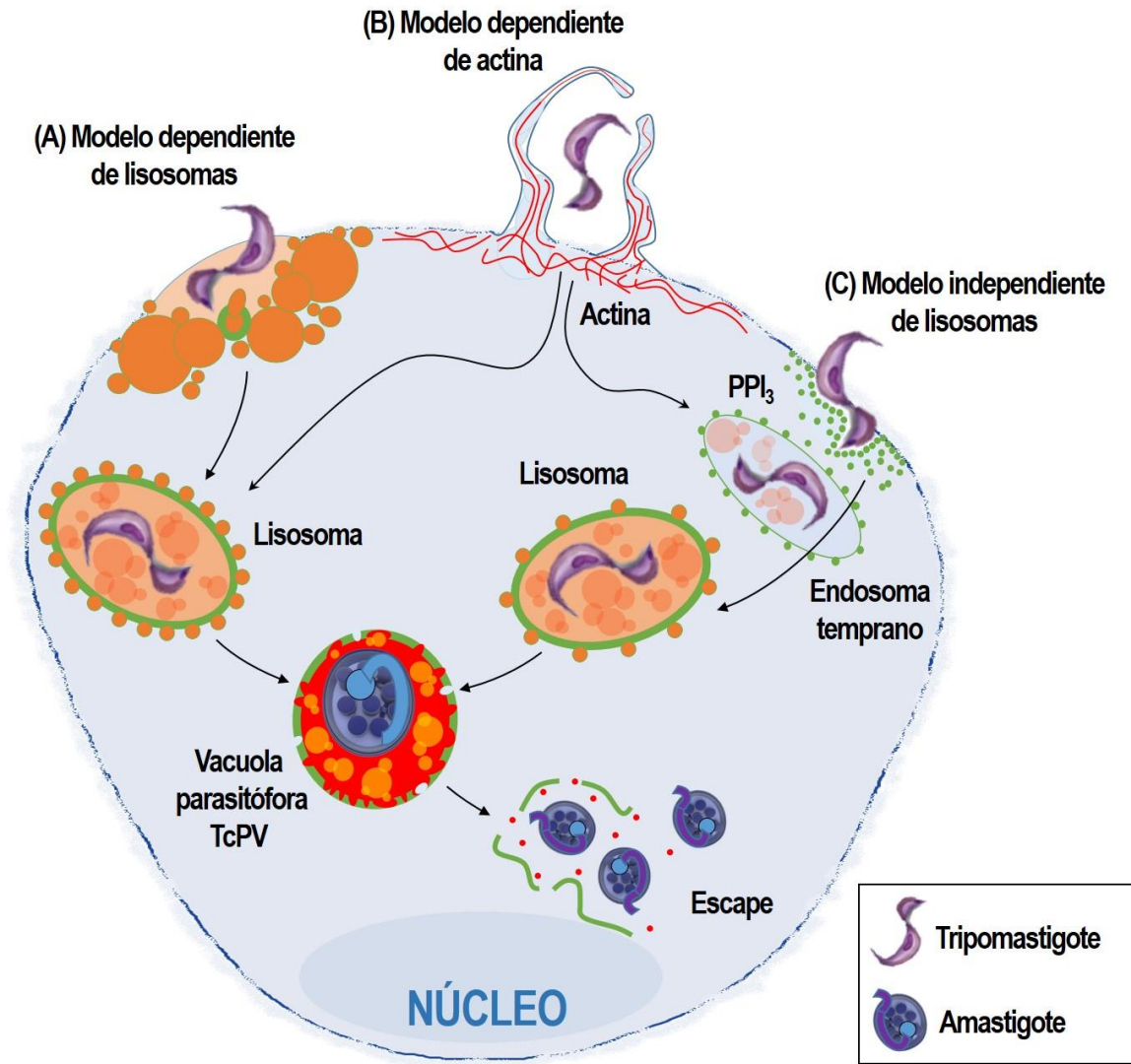


Figura 5. Diferentes modelos de invasión del *T. cruzi*. (A) Modelo de invasión dependiente de lisosomas, inducido fundamentalmente por aumento de Ca^{2+} , regula la formación y exocitosis de los lisosomas en la membrana plasmática. (B) Modelo de invasión dependiente de actina, involucra la formación de pseudópodos y proyecciones de la membrana plasmática por polimerización del citoesqueleto de actina, culminando en la formación de la TcVP. (C) Modelo de invasión independiente de lisosomas, involucra la formación de invaginaciones de membrana plasmática, ricas en fosfatidil inositol (producto de la PI3K). Basado de: de Souza, W. et al. 2010.

Aunque el *T. cruzi* puede utilizar diferentes estrategias para invadir el citoplasma de la célula hospedadora, (como mecanismos dependientes/independientes de lisosomas, la vía de autofagia o la penetración de la membrana), el macrófago induce la fagocitosis como parte de un programa inflamatorio, proceso que le permite matar a los microorganismos envolviéndolos en membrana plasmática y fusionándolos con lisosomas (Figura 5) (40). La fagocitosis, en este contexto, se despliega entonces como un mecanismo antimicrobiano desarrollado por el macrófago para contener al *T. cruzi*, al tiempo que es la principal forma de invasión que utiliza el parásito para ingresar al citoplasma de dicha célula inmune. En este punto, la invasión continúa a través de la activación de diferentes receptores tirosina quinasa (RTK), los cuales inducirán la señalización de diferentes cascadas intracelulares como la vía de las MAPK, la vía PI3K/Akt y la vía de mTOR. Complementariamente, el aumento del Ca^{2+} intracelular promueve el remodelamiento del citoesqueleto de actina y la movilización de lisosomas al punto de ingreso (Figura 5) (39, 40, 53, 54).

1.2.2 El escape

Teniendo presentes los diferentes mecanismos a través de los cuales el *T. cruzi* ingresa al citoplasma celular, se ha demostrado que los fagosomas y lisosomas utilizados por el macrófago para matar al *T. cruzi*, eventualmente son utilizados por el parásito como plataforma de escape hacia el citoplasma para continuar con su ciclo de replicación. Una vez el macrófago ha fagocitado al tripomastigote y fusionado sus lisosomas con los endosomas que lo encierran, se forma un entramado de membranas denominado vacuola parasitófora (VP) (19, 40, 55). Este compartimento intracelular, se caracteriza por contener anclado a su membrana NADPH oxidasas y bombas de protones dependientes de ATP, que tienen por función principal acidificar el interior del

compartimento y activar diferentes enzimas hidrolíticas, proteínas, péptidos microbicidas y ON (31, 49, 56-59). En este microambiente de pH 4.5–5, el parásito comienza la fase de transformación de tripomastigote hacia amastigote y, por tanto, el inicio de su replicación. La disrupción de la vacuola parasitófora comienza con la actividad de las transialidasas/neuroaminidasas que remueven los residuos de ácido sálico de la membrana volviéndola más susceptible estructuralmente a la lisis. Además de este evento de lisis, el parásito induce la formación de poros sobre dicha membrana, mediante el componente TC-TOX, estructuralmente similar al componente C9 del complemento (19, 40, 55).

1.2.3 Polarizando al macrófago

Para entender cómo el *T. cruzi* inicia la replicación en el interior del macrófago, hay que tener presente que el parásito subvierte a su favor el metabolismo de la L-arginina, una ruta metabólica fundamental y característica de esta célula inmune, a partir de la cual induce un microambiente intracelular rico en poliaminas (prolina, putrescina y espermina), favorable para su descendencia (49, 60, 61). Sin embargo, ¿cómo logra el tripomastigote evadir el estado inflamatorio de una célula tan agresiva como el macrófago? Para responder este interrogante, hay que recordar que el conjunto de eventos fisiológicos en general y metabólicos en particular de cualquier célula dependen, entre otras cosas, de la expresión y regulación de un determinado conjunto de genes. En este sentido es importante destacar que, a diferencia de la mayoría de células en nuestro organismo, los macrófagos poseen una gran plasticidad genética, es decir, son capaces de activar o desactivar programas de genes completos de acuerdo al contexto en el que se encuentren. Dicha plasticidad les permite discriminar diferentes señales microambientales y responder a las mismas con el desarrollo de distintos fenotipos, como son el fenotipo clásico

(expresado frente infecciones), o el fenotipo regulatorio encargado de la homeostasis de los diferentes tejidos. La estrategia del *T. cruzi* consiste en explotar dicha plasticidad genética para modular un fenotipo (y por tanto un metabolismo) que favorezca la producción de poliaminas y prolina, asegurando la supervivencia de su descendencia. Como se verá a continuación, las características biológicas que hacen del macrófago una célula fagocítica con gran habilidad para adaptarse a diferentes microambientes, son la principal herramienta mediante la cual el *T. cruzi* puede sobrevivir en su interior.

1.3 En el interior del macrófago

El macrófago es un tipo de célula inmune de origen mielóide que participa en la respuesta efectora innata, y se encuentra remodelando e inmunovigilando prácticamente a todos los tejidos del organismo. Con una remarcable habilidad fagocítica, los macrófagos circulan por los intersticios del tejido, removiendo el desecho celular y los cuerpos apoptóticos resultantes de su remodelamiento (18-20, 62, 63). El mantenimiento de los tejidos por parte del macrófago puede ocurrir a través de mecanismos inmunológicamente independientes, es decir, que responden principalmente a señales fisiológicas propias del tejido. Sin embargo, frente a una modificación en la homeostasis tisular o a un agente infeccioso, los macrófagos son capaces de reconocer la gran variedad de señales extracelulares circulantes y adaptar la respuesta inmunológica según el escenario y su dinámica en el tiempo (22-24). Como se mencionó previamente, a diferencia de otras células del sistema inmune, los macrófagos interpretan la matriz de señales extracelulares en la que se encuentran expresando diferentes clases de fenotipos, cada uno caracterizado por utilizar mecanismos inmunológicos específicos que, en algunos casos, son excluyentes (Figura 6).

El resultado de las señales extracelulares por causa de la necrosis o del foco infeccioso, representan la presión ambiental que condiciona al macrófago y lo induce a responder con el fenotipo que mejor se adapte a dichas señales.

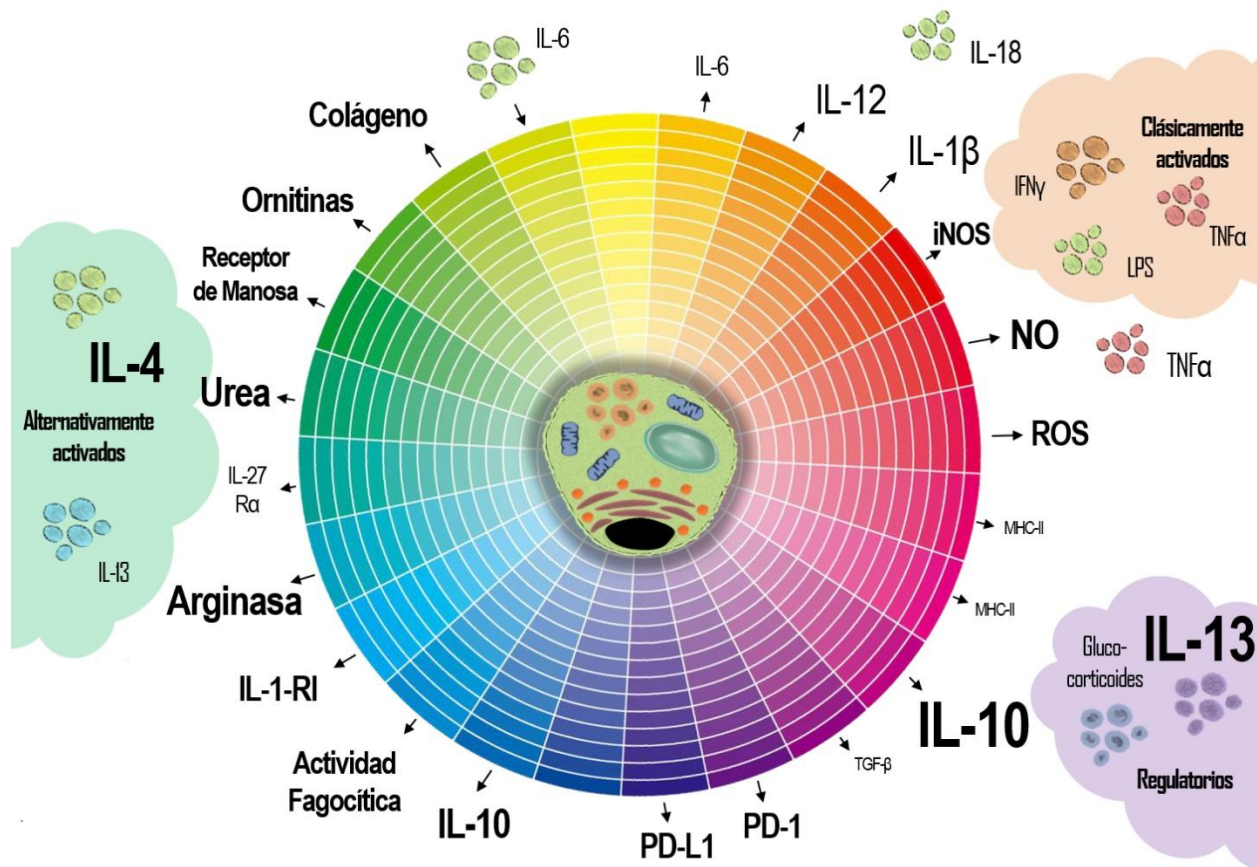


Figura 6. Espectro fenotípico del macrófago. Todas las combinaciones potenciales de genes forman un amplio espectro fenotípico disponible para que el macrófago pueda responder a las diferentes señales de su microambiente celular. De esta forma, se pueden generar **macrófagos inflamatorios o clásicamente activados**, que se caracterizan por la elevada actividad de su enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). También, se pueden generar **macrófagos regulatorios** capaces de controlar la respuesta de otras células del sistema inmune a través de la expresión de moléculas PD-L1 y PD-L2. En otros contextos se pueden generar **macrófagos alternativamente activados**, que se caracterizan por la elevada actividad de su enzima arginasa.

En un intento simplificado por describir los diferentes fenotipos expresados por el macrófago (63), se han diseñado 3 categorías con características fenotípicas particulares (31, 32, 64-67). Así, se pueden diferenciar los denominados macrófagos *regulatorios*, presentes en estados inflamatorios avanzados con una elevada producción de radicales oxígeno y nitrógeno o citoquinas inflamatorias como TNF α , y que tienen como principal función prevenir la injuria prolongada sobre el tejido y limitar la respuesta inflamatoria a través de la producción de TGF- β e IL-10. Los macrófagos agrupados en esta categoría se caracterizan por necesitar 2 señales o estímulos para inducir su actividad antiinflamatoria. La primera señal (dada por receptores Fc, prostaglandina, adenosina o células apoptóticas) es acompañada por la estimulación de algún ligando TLR, que reprogramará al macrófago para que produzca IL-10, y reprima la producción de IL-12. Teniendo en cuenta que la IL-10 es un potente inhibidor de varias citoquinas inflamatorias, los macrófagos regulatorios son potentes inhibidores de la inflamación, y aunque no pueden contribuir con la producción de matriz extracelular ni expresar la enzima arginasa como los denominados macrófagos *alternativos*, pueden expresar moléculas coestimuladoras y llevar a cabo presentación antigénica (63, 68). Por otro lado, los denominados macrófagos activados alternativamente o *reparadores* (del inglés “*wound healing*”), se diferencian en presencia de señales Th2 o antiinflamatorias como la IL-4, la cual puede desactivar al estallido respiratorio, promover la inducción de fibronectina y aumentar la síntesis de prolinas (63, 69). Esta clase de macrófago tiene como principal función la inmunovigilancia del tejido, y en situaciones de injuria o infección, la producción de moléculas antiinflamatorias como IL-10 y la secreción de matriz extracelular. Además, la capacidad de este tipo de macrófagos para suprimir la proliferación de las células T, explica su presencia en placenta y pulmón, y su rol inmunoprotectivo en los tejidos. La polarización y el mantenimiento de este fenotipo reparador se logran, entre otras cosas, a través de

la inhibición de circuitos inflamatorios como el del NF- κ B, de genes como el de la IL-12, del TNF α y de la enzima iNOS (49, 60, 63). Varios estudios sugieren que esta clase de macrófago contribuye también a la eliminación de parásitos helmintos y nematodos a través de la producción de quitinasas y moléculas similares como YM1 y CHI3L3, las cuales degradan las superficies ricas en quitina de estos parásitos. Este tipo de macrófago se caracteriza por una elevada actividad fagocítica y la expresión de CD23, CD11b y del receptor de manosa. Al igual que los fenotipos regulatorios, los fenotipos alternativos también son blanco de varios parásitos celulares obligados como el *T. cruzi*, que los utilizan como nicho de reproducción (49, 60, 61, 68) y, aunque el metabolismo de la L-arginina es característico de la expresión del fenotipo alternativo, no es exclusivo de esta categoría de macrófago ya que a partir de este mismo aminoácido los denominados macrófagos *activados clásicamente* ejercen su funciones microbicidas. Mutuamente excluyentes, el *switch* necesario hacia uno u otro fenotipo depende del microambiente de señales en el que el macrófago se encuentre y de la inducción de la enzima arginasa I o de la enzima iNOS.

El tercer fenotipo de macrófago lo expresan los denominados macrófagos *activados clásicamente*, y es conocido por ser el primer fenotipo efector descrito para esta clase de célula inmune. Es inducido por señales Th1 o inflamatorias, como la IL-12, IFN γ o TNF α , las cuales promueven la expresión de radicales como el ON, especies reactivas del oxígeno y quinureninas, entre otros compuestos microbicidas (64, 65). La principal función de los macrófagos clásicamente activados es la defensa inmunológica contra diferentes clases de patógenos tales como bacterias, virus, parásitos y hongos. Dicha defensa la llevan a cabo a través de la inducción de diferentes mecanismos inmunológicos, de la activación de otras células de la inmunidad innata o de su vinculación con linfocitos T y B para generar una respuesta adaptativa. Al igual que los macrófagos regulatorios, la expresión del fenotipo clásico depende de dos señales: la primera señal, modulada

a través del IFN γ y una segunda señal a través de ligandos TLR, como lipopolisacárido (LPS). Ambas señales confluyen en la inducción de la enzima iNOS y la consecuente producción de TNF α , IL-12, IL-6 e IL-1 β (31-33, 64, 65). Aunque la expresión de esta enzima y su consecuente producción de ON es el mecanismo más característico de los macrófagos clásicamente activados, según el tipo de injuria o el agente patógeno con el que se encuentren, pueden responder con otros mecanismos microbicidas, muchas veces activados por producción de ON. Dentro de estos mecanismos podemos mencionar a la enzimaIDO (Indoleamina 2,3-dioxigenasa), que en células infectadas provoca un potente efecto bactericida mediante la degradación del triptófano, provocando la muerte de patógenos intracelulares a través de la depleción de aminoácidos. También tienen un efecto bactericida los metabolitos que resultan de la actividad catalítica de esta enzima, como las quinureninas (70, 71). Otro mecanismo inflamatorio característico de esta clase de macrófago es el inflamasoma, un complejo proteico de activación de caspasa-1/11 característico de la inmunidad innata. Esta plataforma enzimática está formada por un receptor con dominio de oligomerización y unión a nucleótido (NLR), la proteína ASC y la caspasa-1 u 11. Su activación resulta en la generación de caspasas inflamatorias y en el procesamiento de la pro IL-1 β y la pro IL-18 hacia sus formas activas: la IL-1 β y la IL-18 (72, 73). Además de la expresión de estos circuitos inflamatorios, su activación promueve la producción de moléculas efectoras microbicidas como el ON, ROS citoplasmáticas y mitocondriales e incluso, dependiendo del contexto, pueden desencadenar un tipo de muerte celular inflamatoria denominada *piroptosis* (17, 32, 33, 70, 74-76).

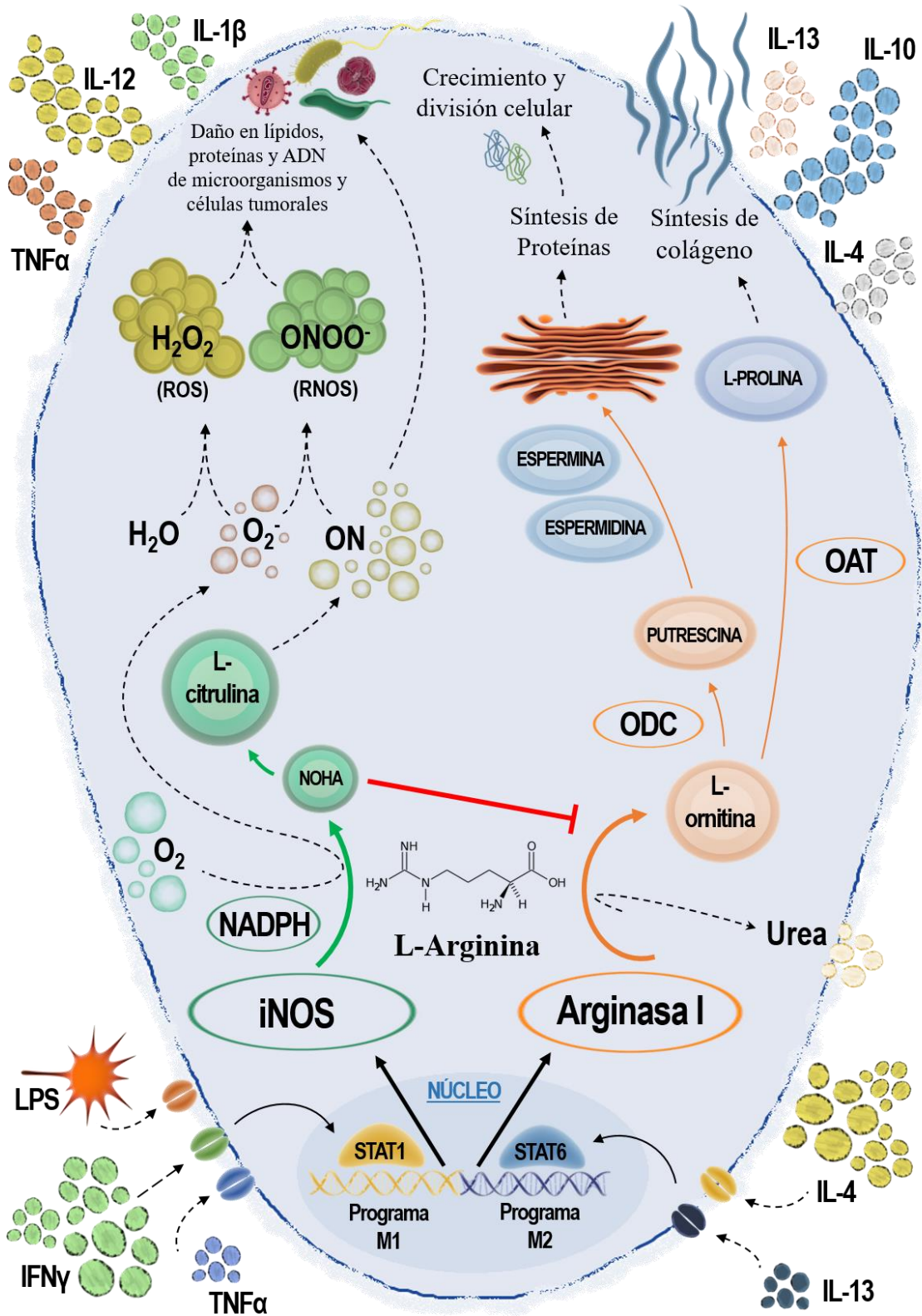


Figura 7. Balance iNOS/Arginasa y el metabolismo de la L-arginina en el macrófago. Dependiendo del microambiente celular en el que se encuentre (señales Th, citoquinas o antígenos foráneos) el macrófago inducirá la expresión del circuito M1 o M2 a partir del metabolismo del aminoácido L-arginina. Según se exprese la enzima iNOS o la enzima Arginasa, se inducirán las moléculas y mecanismos efectores necesarios para la función del macrófago en dicho contexto ambiental.

De acuerdo a lo expuesto previamente, es evidente la fina regulación que debería existir entre los productos de la vía metabólica de la iNOS y de la vía metabólica de la arginasa I, dado que ambas enzimas compiten por el mismo sustrato (Figura 7). En este sentido, ha sido descrito que NOHA, una forma intermedia en la síntesis de ON, inhibe la expresión de arginasa I. Sin embargo, esta última puede afectar la expresión de iNOS a través de la depleción de la L-arginina, y de la producción de poliaminas (77)(78-80). Por último, a pesar de que la constante de afinidad de la iNOS para la L-arginina es 1000 veces menor que la de la Arginasa I, la V_{max} de ésta es más de 1000 veces mayor que la de la iNOS, lo que resulta en una utilización similar de L-arginina por parte de estas dos enzimas, y por tanto, una competencia entre ellas por el sustrato (81). En condiciones fisiológicas y ausencia de estimulación inmune, los macrófagos utilizan poca L-arginina y, generalmente, son los de fenotipo *alternativo*. Tras una estimulación particular se incrementa el transporte de L-arginina dentro de la célula ya que se induce la expresión tanto de los transportadores CAT como de las mencionadas enzimas. La observación de que el balance iNOS/Arginasa I se encuentra regulado por estímulos opuestos, ha permitido a los investigadores no sólo determinar el estado de activación del macrófago, sino también comprender la remarcable plasticidad genética que tiene esta célula y que le permite, por tanto, expresar diferentes fenotipos. Nuestro grupo de investigación ha contribuido con varios reportes que ponen de manifiesto diferentes componentes de la estrategia de invasión que tiene el *T. cruzi* para explotar dicha plasticidad genética y favorecer su reproducción. En este sentido, una vez que el parásito escapa de la vacuola parasitófora, despliega diferentes herramientas moleculares que le permiten, además

de subvertir los mecanismos microbicidas e invadir el citoplasma celular, modificar por completo el metabolismo del macrófago y favorecer su supervivencia y replicación. Nuestro grupo reportó que dentro del citoplasma, el *T. cruzi* puede liberar Cz que tiene como principales funciones modular el fenotipo del macrófago en un sentido *alternativo*. En estos estudios, utilizando diferentes fármacos inhibidores de cada vía (como el inhibidor de JNK, SP600125) se observó que la modulación promovida por este patógeno y por la Cz, ocurre a través de la fosforilación de vías de señalización como las TK, PKA y p38 MAPK, y que su activación confluye entre otras cosas, en la producción de citoquinas regulatorias como IL-10 y TGF- β . Además, se demostraron efectos diferentes tanto en los tiempos como en la fosforilación de p38 MAPK y p42/p44 JNK, en los que la Cz fue capaz de favorecer la fosforilación de p38 MAPK, al tiempo de disminuir la fosforilación de p42/p44 y bloquear la fosforilación de JNK inducida con el *T. cruzi* completo. Utilizando al inhibidor SP600125, se demostró también que la inhibición de JNK favorece la expresión de arginasa y por tanto el crecimiento del *T. cruzi*. En este sentido, se observó que la inhibición de estas cascadas de señalización fue capaz de disminuir la expresión de arginasa I, incluso en presencia de Cz, afectando la supervivencia del parásito. Nuestros reportes previos demuestran en conjunto que la Cz y el parásito, son capaces de modificar el balance metabólico de la iNOS/arginasa I, el balance de las citoquinas IL-12/IL-10, inducir la expresión de receptores regulatorios como PD-L1 y PD-L2, inducir la expresión del receptor de manosa, y limitar la producción de ON (49, 60, 61, 82-85).

1.4. La vía de mTOR y el *T. cruzi*

Dado que la expresión y mantenimiento de un determinado fenotipo en un microambiente particular dependen, entre otras cosas, del estado metabólico del macrófago, muchos esfuerzos se han enfocado en comprender las diferentes redes metabólicas celulares y su participación en la respuesta inmune y los eventos de polarización del macrófago (86-88). Una de las principales vías de señalización y gran moduladora de diversos eventos tanto metabólicos como inmunológicos dentro del macrófago, se conoce con el nombre de su principal componente, la quinasa mTOR (Figura 8) (89-93). Esta proteína es una serina/treonina quinasa altamente conservada entre los organismos eucariotas, capaz de formar dos complejos catalíticos conocidos como mTORC1 y mTORC2. Esta vía de señalización es conocida por modular diferentes funciones celulares, incluyendo el crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular a través de la integración de diferentes señales referidas a nutrientes, estado energético, factores de crecimiento, citoquinas, entre otros (94, 95).

Las diferentes señales del microambiente confluyen en la activación del eje PI3K-Akt, que tiene como principal función activar a mTOR, removiendo su complejo inhibidor denominado TSC1/2. Este complejo regula a RHEB, una proteína reguladora de la actividad GTPasa de mTOR. Cuando TSC1/2 es fosforilado por Akt, libera a RHEB promoviendo la formación del complejo mTORC1.

En un contexto general, la síntesis de proteínas es el proceso mejor conocido por estar controlado por mTOR, dado que su actividad quinasa fosforila a la proteína 1 de unión a factor regulador de la iniciación de la traducción eucariótica (4EBP1) y a la proteína quinasa P70S6K. La fosforilación de 4EBP1 previene su unión al factor regulador de la iniciación de la traducción eucariótica (eIF4E), permitiéndole al mismo participar en la iniciación dependiente de CAP

(Caperuza: 7-metilguanosina trifosfato). La fosforilación de la quinasa P70S6K promueve la biogénesis de mRNA, así como también la iniciación y elongación de la traducción proteica (96). La función inmunológica de mTOR se ha reportado en estudios donde su actividad reduce la producción de IL-12 e IL-23 después de la estimulación con LPS a macrófagos humanos (86). En este sentido, cuando se bloqueó la actividad de mTOR en DDMO y MDMO murinos la producción de IL-10 se redujo, al tiempo que aumento la de IL-12 (92, 97, 98). Estas observaciones demuestran que la activación de mTOR limita las respuestas inflamatorias, pero otros estudios han mostrado que los macrófagos deficientes para TSC1 producen elevadas concentraciones de TNF α , IL-12p70 e IL-6 en respuesta a ligandos TLR como LPS, al tiempo que reducen la producción de IL-10 (99-101). Sin embargo, a pesar de los diferentes estudios sobre el rol de mTOR sobre el sistema inmune (principalmente en células T), se conoce muy poco acerca de la función de esta vía de señalización en macrófagos durante la infección con *T. cruzi*.

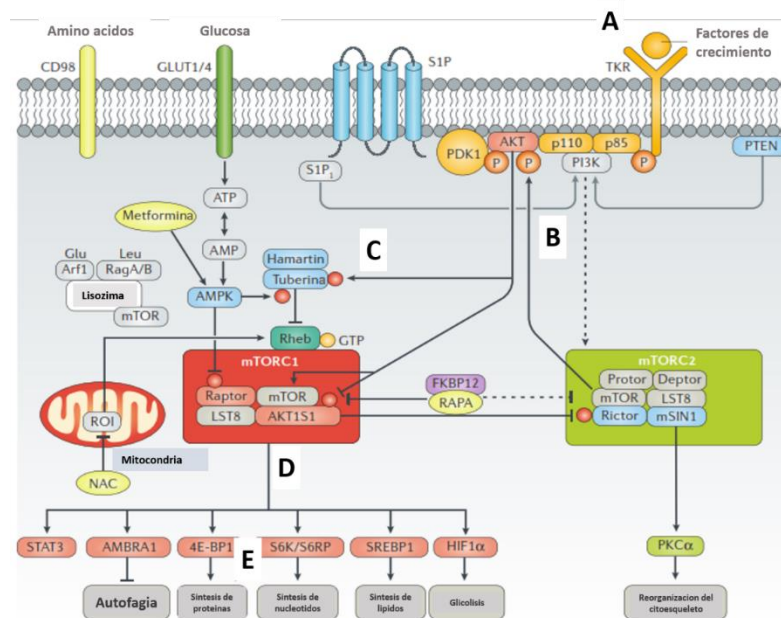


Figura 8. Vía de señalización de mTOR. (A) Señales del microambiente celular como factores de crecimiento, ATP o glucosa activan al eje (B) Akt-PI3K cuya principal función es fosforilar (inhibiendo) al complejo (C) TSC1/2 para que libere a la GTPasa RHEB y se forme el complejo (D) mTORC1, activando así (E) la síntesis de proteínas, de nucleótidos, de lípidos y progreso a través del ciclo celular. Adaptado de Perl *et al*, 2017.

2. HIPÓTESIS

Teniendo presente este marco teórico, la hipótesis planteada para este trabajo doctoral fue:

Si la infección del macrófago por el T. cruzi involucra la activación de la vía de mTOR y la inducción del fenotipo M2, entonces la inhibición de esta vía de señalización en sus diferentes niveles, bloquearía la inducción de circuitos alternativos, al tiempo que activaría los circuitos inflamatorios del macrófago, confluyendo ambos escenarios en un efecto desfavorable para la sobrevivencia y replicación del parásito.

3. OBJETIVOS

General

Estudiar la participación de la vía **mTOR** en la activación y polarización del macrófago durante la infección con *T. cruzi*.

Específicos

Nº 1. Evaluar el estado de activación de la vía de mTOR en macrófagos murinos infectados con *T. cruzi*.

Nº 2. Estudiar el efecto de la inhibición de la vía de mTOR sobre el **perfil de activación** de macrófagos y la sobrevivencia del *T. cruzi*.

Nº 3. Estudiar los **mecanismos inflamatorios** activados por la inhibición de mTOR en macrófagos infectados con *T. cruzi*

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Modelo animal

Los ratones BALB/c fueron adquiridos de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA, Buenos Aires, Argentina). Los machos de ratones TNF α -RKO (B6.129-Tnfrsf1a^{tm1Mak}), IL6KO (B6.129S2-Il6^{Jtm1Copf}), IFN α RKO (Ifnar^{1tm1Ag}), CASP1/11KO (B6N.129S2-Casp1^{tm1Flv/J}) y NLRP3KO (B6.129S6-Nlrp3/J^{tm1Bhk} (background C57BL/6), fueron obtenidos de Jackson Laboratory. Los ratones C57BL/6 fueron obtenidos de la Universidad Nacional de La Plata. Todos los animales utilizados en el presente trabajo de investigación fueron mantenidos en el bioterio y bajo las normas por las que se rige el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología – CIBICI – CONICET – CICUAL (nro. 2016-213) (102).

4.2 *Trypanosoma cruzi*

La forma tripomastigote del *T. cruzi* (cepa Tulahuen) con las que se llevaron a cabo los diferentes ensayos experimentales, fue obtenida a partir de dos instancias de infección: en la primera instancia, los tripomastigotes se obtuvieron al día 11 posinfección (p.i.) a través de la centrifugación de sangre de ratones infectados, y resuspendidos en RPMI SBF 10%. En la segunda instancia, dichos tripomastigotes, fueron utilizados para infectar cultivos de la línea celular Vero a fin de replicar al parásito. Siete días p.i. se recolectaron los sobrenadantes y se centrifugaron a 2056 rcf durante 10 min. Los parásitos obtenidos fueron contados en cámara de Neubauer y congelados a -80°C o utilizados para los diferentes experimentos de infección (103).

4.3 Macrófagos peritoneales y derivados de médula ósea

Para obtener los macrófagos derivados de médula ósea (MDMO), la médula ósea fue obtenida a partir de los huesos del fémur y la tibia de ratones BALB/c, C57BL/6 y KO, resuspendida en RPMI 1640 frío, conteniendo 40 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, siguiendo procedimientos estándares (43). Estas células progenitoras de médula ósea recuperadas se cultivaron en placas para bacterias de 100 mm, que contenía SFB 10%, 40 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina, L-glutamina 2 mM y medio condicionado derivado del cultivo de células L929 (LCM) al 30%, durante 4 días (104). Luego, los progenitores de médula ósea se suplementaron con RPMI + LCM al 30%. Al día 6, se usaron los MDMO como se indica (Figura 9 y 10). Los ratones BALB/c fueron infectados intraperitonealmente (103), y los macrófagos peritoneales (PM) se extrajeron y procesaron usando diferentes técnicas, según sea pertinente. Los animales no infectados se procesaron en paralelo como control (Figura 9).

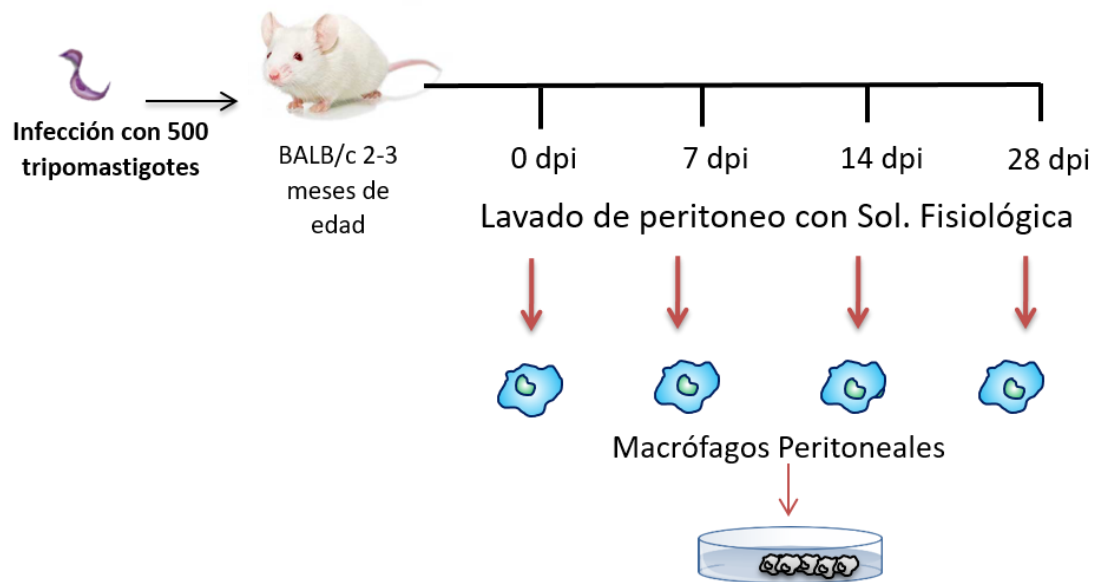


Figura 9. Modelo de infección de ratones BALB/c y obtención de macrófagos peritoneales a diferentes días posinfección.

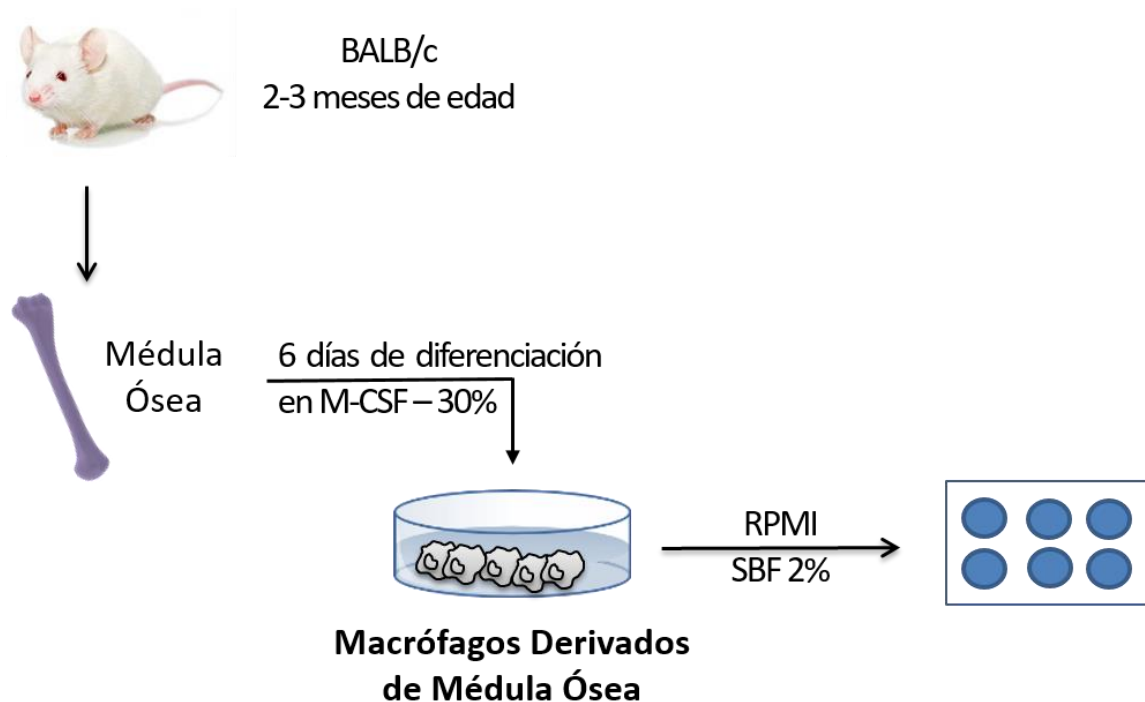


Figura 10. Modelo de obtención de macrófagos derivados de médula ósea.

4.4 Insumos y reactivos

El dimetilsulfóxido (DMSO), Clorhidrato de 2-4-morfolinil-8fenil-1-benzopirán-4-ona (LY294002), Cloruro de difenilendonio (DPI), reactivo de Griess, 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) e Inhibidor de fosfatasa “PhosphoStop” fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA); Rapamicina y Fluorsave fueron obtenidos de Calbiochem (Darmstadt, Alemania). El Hidrato de pp242 (PP242) fue obtenido de Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA). Interferon gama (IFN γ), interleuquina 4 (IL-4), kits de ELISA sándwich para IL-10, IL12p70, TNF α , IL-6 e IL-1 β y los anticuerpos para FACS anti CD11b (APC) y anti F480 (PE y FITC), fueron obtenidos de BioLegend (San Diego, California, USA). Lipopolisacárido (InvivoGen), 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM DA), 2',7'-diclorodihidrofluoresceína

(H₂DCF-DA), fueron obtenidos de Invitrogen (Carlsbad, California, USA). El marcador de peso molecular y el MitoSOX™ Red fue obtenido de Thermo Fisher Scientifics (Waltham, MA, USA). Los anticuerpos de Western Blot anti p-mTOR, anti p-P70S6K, anti p-4EBP, anti ATP citrate liasa, anti β-actina, anti NLRP3 y anti IL-1β fueron obtenidos de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Los anticuerpos para Western Blot anti Arginasa I e iNOS, fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Palo Alto, California, USA). Los anticuerpos secundarios fluorescentes anti Rabbit IRDye 680RD y anti Mouse IRDye 680RD fueron obtenidos de LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA). El anticuerpo secundario anti IgGh marcado con fluorocromo FITC, fue obtenido de Biocientifica (Buenos Aires, Argentina). El coctel de inhibidores fue adquirido en Roche (Basilea, Suiza).

4.5 Modelos de inhibición

Inhibidores de la vía de mTOR. Macrófagos peritoneales y derivados de médula ósea, obtenidos de ratones BALB/c y C57BL/6, fueron tratados con diferentes inhibidores: rapamicina (50 o 100 nM), PP242 (40 u 80 nM) y LY94002 (10 o 50 nM). Cada inhibidor fue resuspendido por separado en RPMI SBF 2%, y cultivado junto con los macrófagos durante 90 min. A continuación, los macrófagos fueron lavados 3 veces con PBS temperado para remover el inhibidor, y fueron preparados para los estímulos correspondientes de cada experimento.

Inhibidor de IDO. Macrófagos derivados de médula ósea obtenidos de ratones BALB/c y C57BL/6, fueron tratados con el inhibidor 1-MT (10 μM) solo, o con el inhibidor 1-MT con rapamicina, durante 24 h y 24 h/1.5 h, respectivamente. A continuación, los macrófagos fueron lavados 3 veces con PBS temperado para remover el inhibidor, y fueron preparados para los estímulos correspondientes de cada experimento.

Inhibidor de ROS. Macrófagos derivados de médula ósea obtenidos de ratones BALB/c y C57BL/6, fueron tratados con DPI (20 μ M). El inhibidor fue resuspendido solo, o con rapamicina, en RPMI SBF 2%, y cultivado junto con los macrófagos durante 3 h. A continuación, los macrófagos fueron lavados 3 veces con PBS temperado para remover el inhibidor, y fueron preparados para los estímulos correspondientes para cada experimento.

El número de células utilizado en las diferentes técnicas fue: 6×10^6 células/pocillo para Western Blot y ELISA, 3×10^6 células/pocillo para citometría de flujo y 3×10^5 células/pocillo para inmunofluorescencia.

4.6 Análisis por citometría de flujo

Para examinar el porcentaje de diferenciación (pureza) de los macrófagos derivados de médula ósea, las células de cada condición fueron levantadas a diferentes tiempos experimentales, y marcadas con los anticuerpos anti F4/80 (FITC y PE) y anti CD11b (APC) durante 20 min a 4°C (103). A continuación, fueron teñidos con el colorante vital AquaDead durante 15 min a 4°C para poder discriminar células vivas de muertas. Para los experimentos que requirieron la determinación de productos intracelulares como el ON y ROS, los macrófagos derivados de médula ósea de cada condición fueron levantados a diferentes tiempos experimentales, e incubados con anti F4/80 y anti CD11b. Posteriormente fueron incubadas con AquaDead y lavadas 3 veces antes de ser incubados con la sonda correspondiente (Figura 11).

Para detectar los niveles de ON citoplasmático (102), las células fueron incubadas con 20 μ M de la sonda DAF-FM diacetato (FITC), durante 30 min a 37°C antes del análisis por FACS. Para la detectar los niveles de ROS citoplasmático (cROS), las células fueron incubadas con 20 μ M de la sonda H₂DCFDA (FITC), durante 20 min at 37°C previo análisis por FACS. Para detectar los niveles de ROS mitocondrial (mtROS), las células fueron incubadas con 5 μ M de la sonda

MitoSOX (PE), durante 15 min at 37°C previo análisis por FACS. Finalmente, todas las condiciones fueron lavadas con solución fisiológica SBF 2%, y resuspendidas para ser analizadas a través del citómetro (FACS Canto II, BD Biosciences).

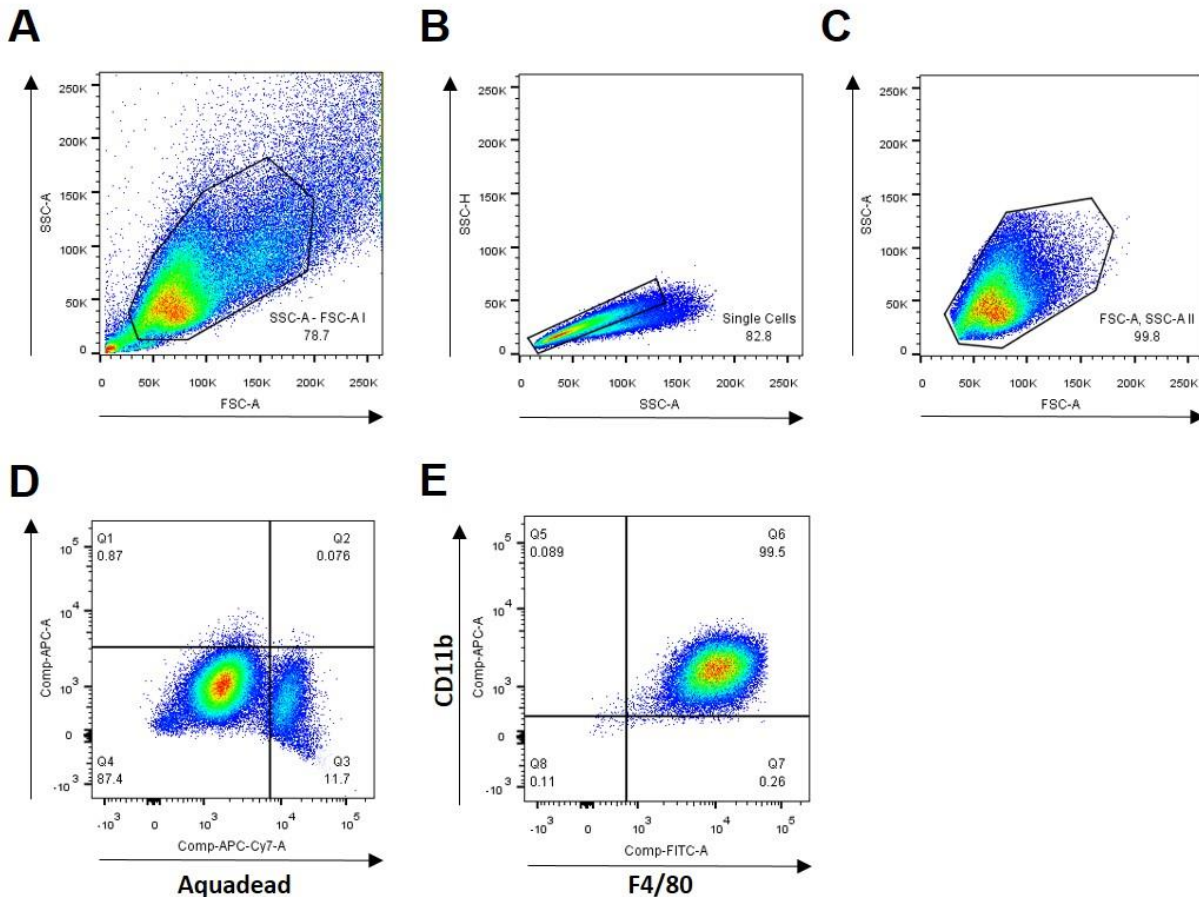


Figura 11. Estrategia de “gates” para el análisis de los macrófagos derivados de médula ósea a través del software Flow Jo. (A) FSC-SSC > (B) Singletes > (C) FSC-SSC 2 > (D) Live/ Dead Aqua stain > (E) F4/80+; CD11b+. Los MDMO obtenidos de ratones BALB/c y C57BL/6 fueron recolectados y marcados con Aqua dead para la discriminación entre células vivas y muertas, y con anti-F480 (PE o FITC) y anti-CD11b (APC) para la determinación del porcentaje de diferenciación.

4.7 Determinación de citoquinas

Las citoquinas fueron cuantificadas a partir de sobrenadantes obtenidos de cultivo, utilizando la técnica de ELISA sándwich. Entre dichas citoquinas se evaluaron: IL-10, IL-12p70,

TNF α , IL-6 e IL-1 β . Cada placa fue sensibilizada con el anticuerpo de captura correspondiente a 4°C, 24 h. A continuación, fueron lavadas e incubadas con PBS-Albumina 1% para bloquear los sitios de unión libres. Luego, se lavaron e incubaron con los sobrenadantes de cada muestra problema o con los estándares recombinantes para cada placa, durante 24 h. Posteriormente, cada placa fue lavada e incubada durante 1 h con el correspondiente anticuerpo de captura marcado con biotina. Después, las placas se incubaron con estreptavidina conjugada con peroxidasa durante 1h. Finalmente, fue agregado el sustrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), cuya naturaleza cromógena permitió leer la reacción a 490 nm en lector de microplacas. Las curvas de calibración fueron diseñadas a partir de los estándares recombinantes de cada citoquina provistos en cada kit.

4.8 Western Blot

Los macrófagos peritoneales y derivados de médula ósea levantados a los diferentes tiempos p.i. experimentales, fueron lavados y resuspendidos en Buffer RIPA (Triton X-100 1%), sodio dodecil sulfato (SDS 0.1%), coctel de inhibidor de proteasas (25X) e inhibidor de fosfatasa (10X) durante 20 min a 4°C. A continuación, todos los lisados fueron centrifugados 4°C, durante 10 min para llevar a cabo la separación de la fracción de las proteínas de la fracción membranas celulares. Los sobrenadantes obtenidos de la centrifugación fueron guardados a -80°C, o preparados para la determinación de proteínas a través de la microtécnica de Bradford (105). Cada lisado de proteínas fue utilizado a continuación para preparar 40 μ g de proteína (por calle) resuspendidos en buffer de muestra-SDS, y calentados en baño seco durante 10 min a 100°C. Para llevar a cabo la separación de los extractos celulares, los lisados fueron sometidos a electroforesis en geles de SDS-10% Tris-glicina o SDS-10% Tris-tricina, a 150 V durante 1 h, y a 100 V durante 3 h, respectivamente. Posteriormente, las membranas fueron coloreadas con rojo Ponceau (0,1%

en ácido acético 5%) para controlar la transferencia y carga proteica en cada calle. Después de lavar 3 veces cada membrana con buffer Tris-HCl 10 mM-NaCl 150 mM Tween-20 0.1% (TBS-t, pH 7,5), fue incubada en solución de bloqueo (TBS-t y leche descremada 5%) durante 60 min. a temperatura ambiente (103). Posteriormente, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti p-mTOR, anti p-P70S6K, anti p-4EBP1, anti Arginasa I, anti iNOS, anti NLRP3, IL-1 β ; y como control de carga anti β -actina o anti ATP citrato liasa. Luego de 3 lavados, cada membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o anti IgG de conejo fluorescentes a temperatura ambiente durante 1 h. Todas las imágenes de bandas fueron procesadas a través del Odyssey CLx con longitudes de onda de 780 y 820 nm. Todas las densitometrías y cuantificaciones fueron hechas con los programas ImageJ e ImageStudio.

4.9 Inmunofluorescencia

Los experimentos se llevaron a cabo cultivando 3×10^5 BMDM en vidrios individuales, previamente esterilizados (durante 2 h, a 180°C) con tripomastigotes (1 célula: 5 parásitos) durante 24 h. Después, los parásitos fueron lavados con PBS a temperatura ambiente, e incubados con RPMI SBF 10% durante 48 h. A continuación, las células fueron fijadas con PBS-formaldehído 4% a 4°C durante 40 min. Posteriormente fueron permeabilizadas con Tritón X-100 0.1% y bloqueadas con PBS SFB 3% por 15 min, a 37°C. Luego, las células fueron incubadas con pool de sueros provenientes de pacientes infectados con enfermedad de Chagas durante toda la noche a 4°C. Seguido a esto, fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-IgGh conjugado con el fluoróforo FITC, durante 1 h a 37°C (82). Posteriormente las células fueron incubadas con DAPI para la tinción nuclear, durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, cada condición fue

lavada 3 veces con PBS, montada con Fluorsave y observadas con microscopio Leica DMI8. La cuantificación de la carga parasitaria se llevó a cabo mediante el programa ImageJ.

4.10 Determinación de ON a través de la reacción de Griess

Sobrenadantes obtenidos a partir de MDMO cultivados en diferentes condiciones experimentales, fueron colectados a diferentes tiempos p.i. y junto con la dilución del estándar de nitrito de sodio, fueron incubados en oscuridad con el reactivo de Griess (106). La reacción fue medida a una absorbancia de 540 nm, en lector de microplacas.

4.11 Reacción de la Arginasa

La actividad de la enzima arginasa fue llevada a cabo lisando las células con Triton X-100 1% junto con el coctel de inhibidores de proteasas, y el inhibidor de fosfatasas, durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se utilizó la microtécnica de Bradford para determinar la concentración de proteínas de cada lisado (105). Seguido a esto, las muestras fueron almacenadas a -80°C , o incubada con 10 μL de Tris-HCL 10 mM y MnCl_2 10 mM, $\text{pH}=7.4$, durante 10 min a 56°C . La hidrólisis de la arginina ocurrió cuando a continuación se agregaron 25 μL de cada lisado con 25 μL de arginina 0.5 M, durante 45 min, $\text{pH}=9.7$ a temperatura ambiente. Junto con las condiciones de la curva estándar para urea, la reacción enzimática en los lisados fue detenida con el agregado de una mezcla de ácidos compuesta por H_2OSO_4 96% / H_3PO_4 85% / H_2O (1/3/7), disueltos en etanol. Finalmente fue agregado el ISPF 9%, incubados durante 45 min a 90°C , y la reacción medida a 540 nm en lector de microplacas (60, 61, 82).

4.12 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la prueba t de Student, a través del software GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software). Las diferencias con un valor de p <0.05 fueron consideradas significativas.

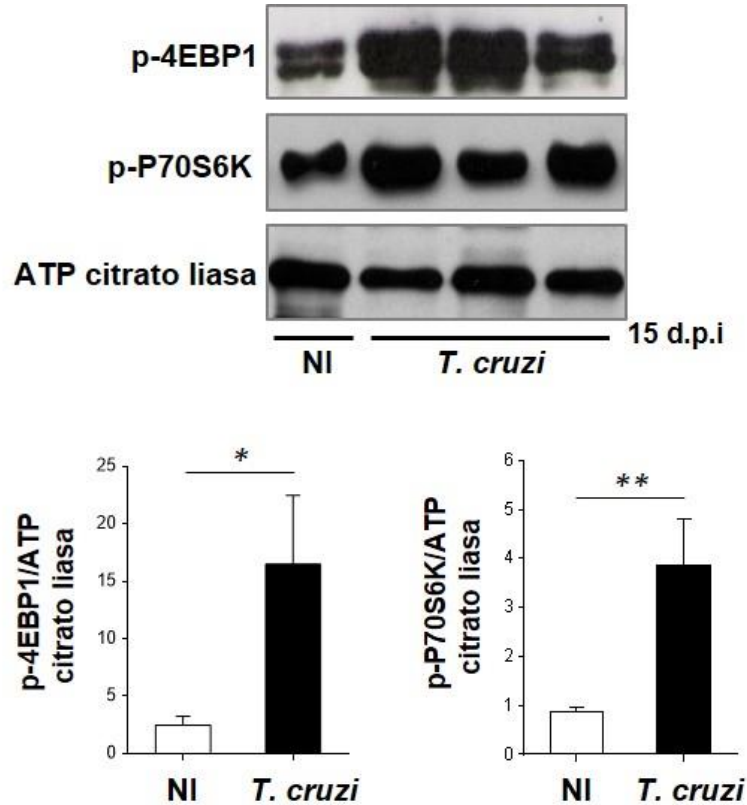
5. RESULTADOS

5.1 El *T. cruzi* y la vía de señalización mTOR en el macrófago

5.1.1 La quinasa mTOR y su participación durante los eventos de replicación del *T. cruzi*

Dada la importancia de la vía mTOR para la ejecución de distintos eventos del ciclo celular, tales como el crecimiento y metabolismo del macrófago, y considerando la capacidad del *T. cruzi* de inducir Arginasa I (49, 60, 61, 68, 82, 84, 85), nos propusimos investigar la posible participación de la vía mTOR en la polarización alternativa inducida por el parásito, la cual le permite continuar con su ciclo de reproducción. Para ello, macrófagos peritoneales fueron obtenidos a los 15 días p.i. a partir de ratones BALB/c infectados con 500 tripomastigotes de la cepa Tulahuen. Los lisados celulares fueron procesados para WB con el objetivo de analizar la expresión de los diferentes componentes de la vía de mTOR, como sus sustratos principales p-4EBP1 y p-P70S6K.

A



B

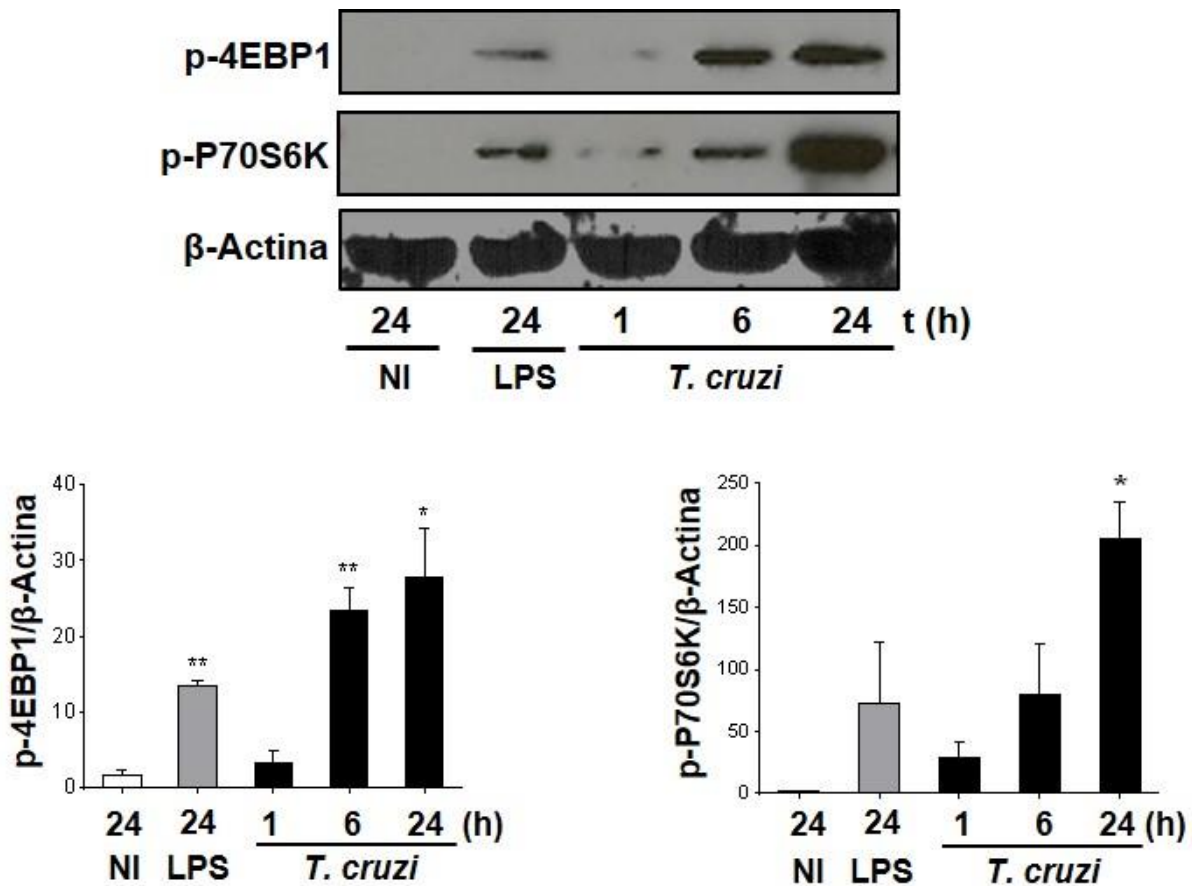


Figura 12. La infección con *T. cruzi* induce la activación de mTOR en los macrófagos. La activación de mTOR fue determinada por la fosforilación de sus sustratos p-4EBP1 y p-P70S6K por WB, utilizando como control de carga β-actina o ATP citrato liasa. (A) Los macrófagos peritoneales (MP) se obtuvieron de ratones BALB/c sin infectar (NI, no infectados) o de ratones BALB/c infectados (*T. cruzi*) a los 15 días posinfección (p.i.). En el WB se observan 3 experimentos independientes y las barras muestran la media ± DE del análisis densitométrico correspondiente de los 3 experimentos independientes (* p < 0.05 respecto al NI; ** p < 0.001 respecto al NI). (B) Macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) sin infección (NI, no infectados) y BMDM cultivados con *T. cruzi*, 1:5 célula/parasito (*T. cruzi*) fueron cultivados durante 1, 6 y 24 h p.i. Además MDMO cultivados sin infección fueron estimulados con LPS 1 μg/ml (LPS) y se utilizaron como control positivo de la activación de mTOR. Los WB corresponden a un experimento representativo, y las barras muestran la media ± DE del análisis densitométrico correspondiente a 3 experimentos independientes (* p < 0.05 respecto al NI; ** p < 0.001 respecto al NI).

Como se observa en la Figura 12-A, los macrófagos peritoneales obtenidos de ratones infectados, aumentaron significativamente la activación de la vía mTOR, induciendo un pico de expresión de p-4EBP1 y p-P70S6K, al día 15 p.i., respecto a los macrófagos control de animales sin infección. Este mismo fenómeno fue observado en macrófagos derivados de médula ósea infectados con *T. cruzi*, en los cuales la activación de dicha vía aumentó significativamente en todos los tiempos analizados (1, 6 y 24 h p.i.), observándose un aumento en la fosforilación de sus sustratos a las 24 h p.i., respecto a los MDMO sin infectar (Figura 12-B). En conjunto, estos resultados nos sugieren que *T. cruzi*, además de modular eventos específicos para inducir un fenotipo alternativo de macrófago (60, 61, 68, 82), estaría promoviendo la activación de la vía de mTOR en el macrófago.

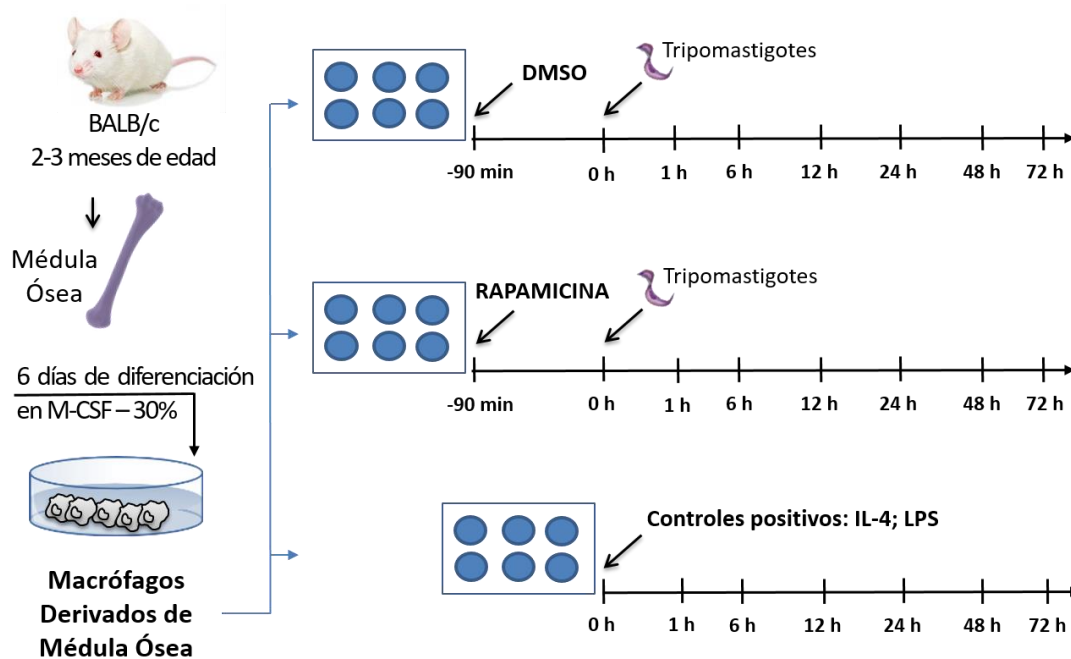


Figura 13 | Modelo de inhibición de la vía de mTOR. Macrófagos derivados de médula ósea, obtenidos a partir de ratones BALB/c fueron pretratados con diferentes inhibidores de mTOR: rapamicina (50 o 100 nM; inhibidor del complejo mTORC1), LY294002 (10 o 50 nM; inhibidor de PI3K), PP242 (40 o 80 nM; inhibidor del dominio ATP de mTOR) o con DMSO (C, control), durante 90 min en RPMI-SBF 2%. A continuación, fueron lavados e infectados con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos) durante 1, 3, 6, 12 y 24 h. Además se utilizaron MDMO estimulados con LPS/IFN γ (100 ng/mL) o IL-4 (80 nM), como controles positivos. Finalmente los macrófagos fueron lavados y preparados para inmunofluorescencia indirecta, WB, ELISA o FACS.

5.1.2 La inhibición de mTOR y la sobrevivencia del *T. cruzi*

En primer lugar, para demostrar que la vía mTOR estaba siendo inhibida, MDMO fueron pretratados con el fármaco rapamicina y posteriormente infectados con *T. cruzi*. Además, MDMO estimulados con LPS+IFN γ o IL-4 fueron utilizados como controles positivos de los fenotipos M1 y M2 del macrófago (Figura 14). De acuerdo con los resultados anteriores, como se observa en la

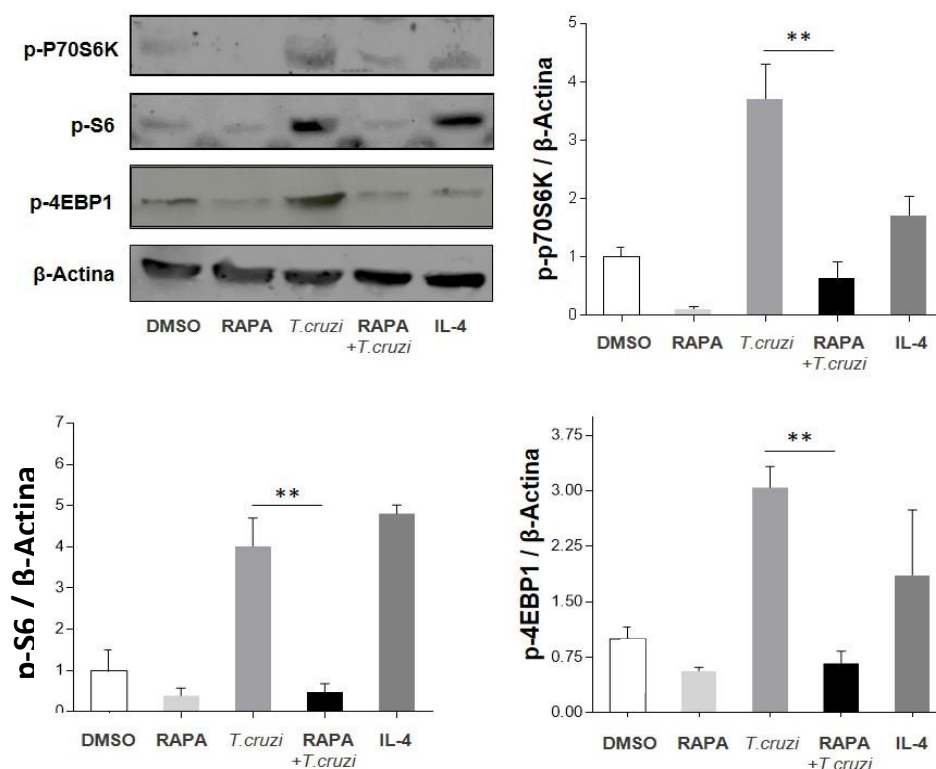
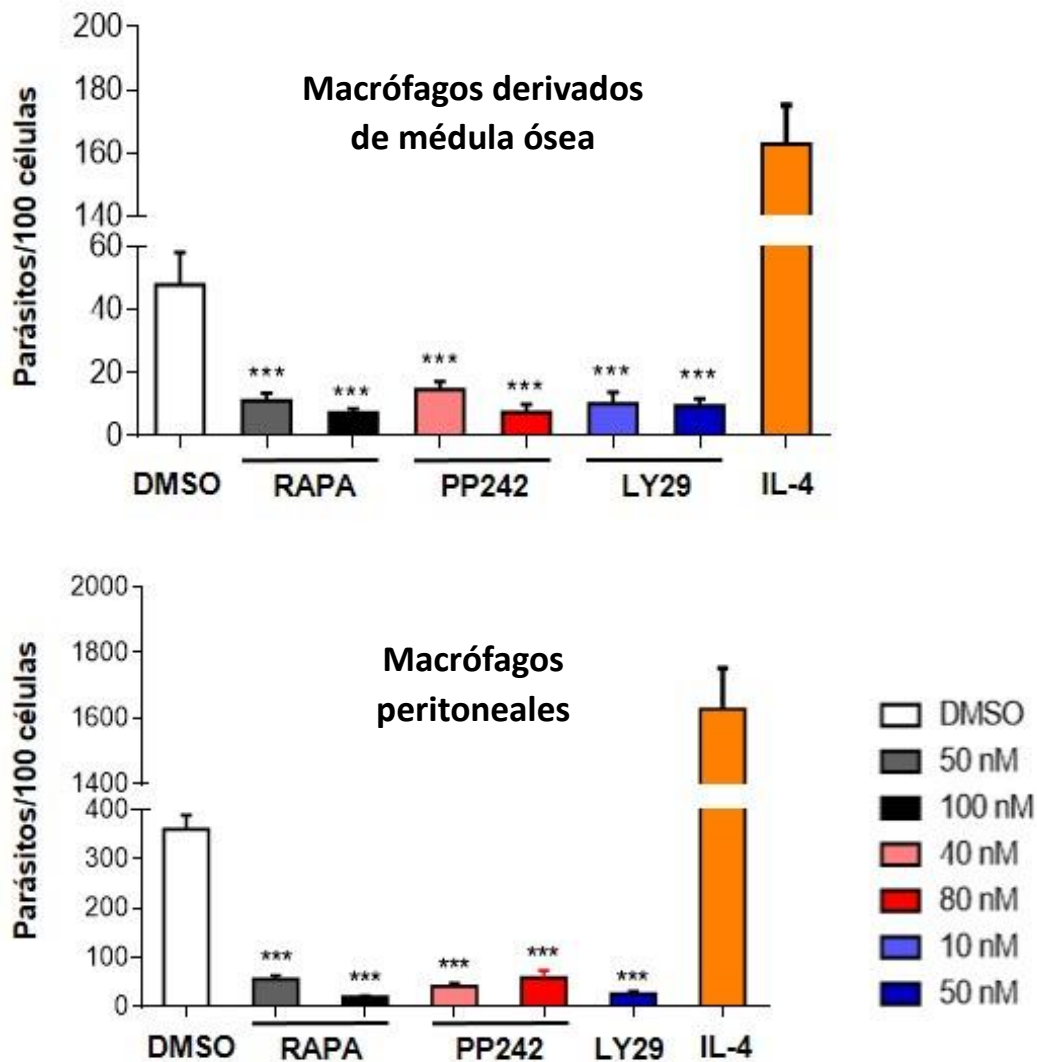


Figura 14 | Inhibición de la vía de mTOR. La inhibición de la vía de mTOR fue evaluada a través de la fosforilación de sus sustratos p-4EBP1, p-S6 y p-P70S6K, utilizando como control de carga β -actina. Macrófagos derivados de médula ósea (MDMO), obtenidos a partir de ratones BALB/c fueron pretratados con DMSO como control, o con rapamicina (100 nM) durante 90 min. A continuación fueron lavados, y cultivados sin infección (NI, no infectados) o infectados con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos) durante 24 h. Además, se utilizaron MDMO sin pretratamiento y sin infección, estimulados con IL-4 (80 nM) durante 24 h como control positivo. Los WB corresponden a un experimento representativo, y las barras muestran la media \pm DE del análisis densitométrico correspondiente a 3 experimentos independientes (** $p < 0.001$ respecto al DMSO).

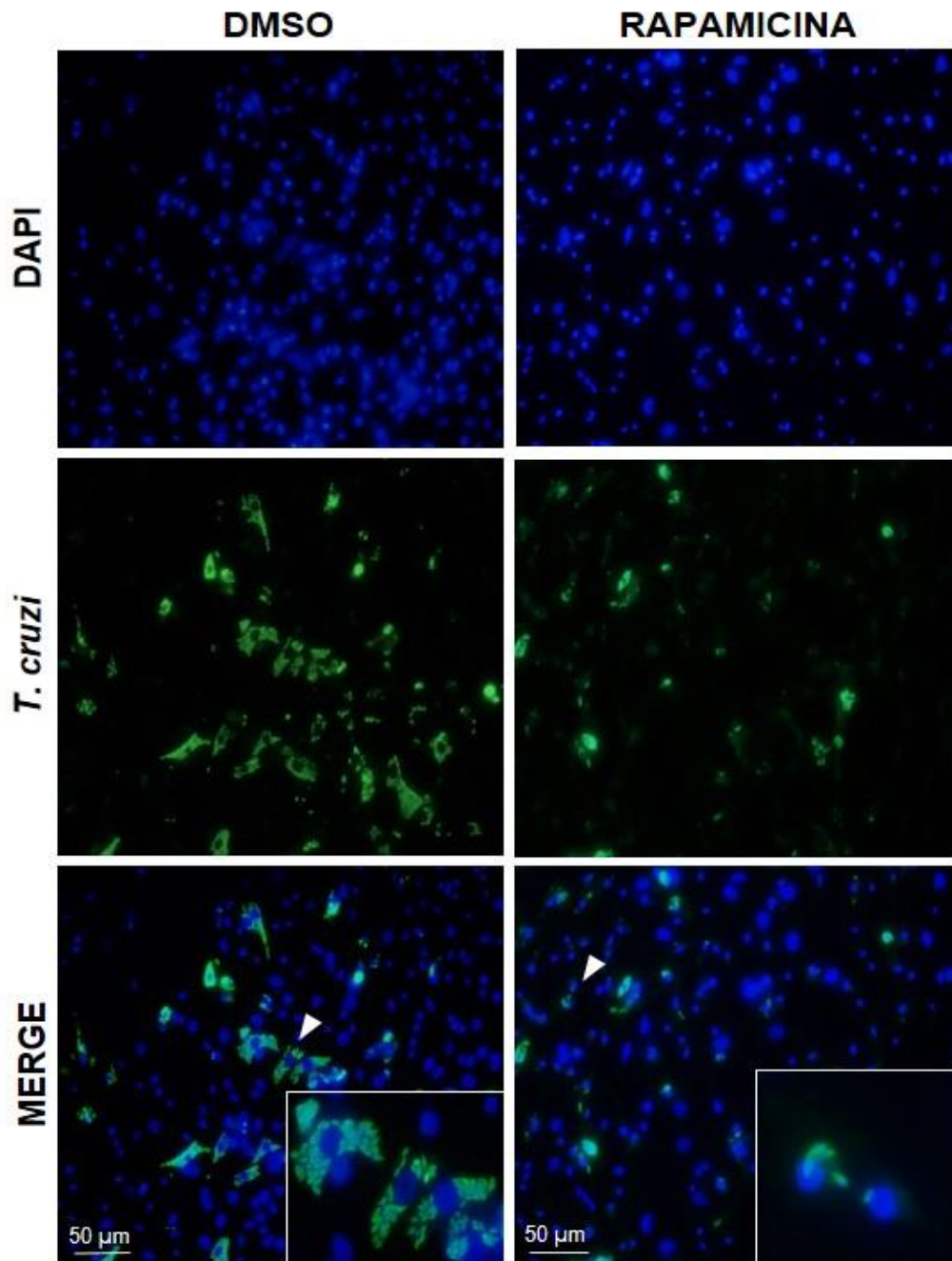
Figura 14 aquellos MDMO controles estimulados sólo con el parásito, mostraron un aumento significativo de la expresión de los sustratos p-4EBP1, p-P70S6K y p-S6, respecto a los controles sin infección. En contraste, aquellos MDMO pretratados con rapamicina, redujeron significativamente la expresión de los sustratos fosforilados mencionados anteriormente. Estos resultados demuestran que la inhibición farmacológica de la quinasa mTOR, estaría impidiendo la fosforilación de sus sustratos, y con ello, la activación de la vía. Para continuar con los objetivos, nuestro modelo de inhibición se complementó utilizando los fármacos LY94002 y PP242 (Figura 13), para la inhibición de la vía mTOR a diferentes niveles en su señalización. Los MP y MDMO fueron pretratados con Rapamicina, LY94002 y PP242, o estimulados con IL-4 o infectados con *T. cruzi*. Luego de 72 h p.i. fueron preparados para inmunofluorescencia (IF). Todas las IF fueron analizadas considerando el número de células infectadas, así como también el número de amastigotes dentro de cada célula (Figura 15). Como se observa en los paneles superiores, aquellos MP o MDMO control, estimulados con IL-4, aumentaron significativamente la carga parasitaria respecto a los controles sin estimular, resaltando la importancia del fenotipo alternativo del macrófago para la replicación del parásito. En contraste, aquellos macrófagos pretratados con los diferentes inhibidores de mTOR, redujeron significativamente la carga parasitaria cuando se los compara con los macrófagos control sin pretratamiento (Figura 15-A). Nuestro siguiente objetivo estuvo dirigido a determinar si el pretratamiento con los fármacos inhibidores pudiera tener un efecto tóxico responsable de la disminución de la carga parasitaria. Para ello, a partir de los sobrenadantes de cultivo obtenidos de MP y MDMO pretratados con los diferentes inhibidores, se midió la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (107), un indicador de muerte celular. Los resultados obtenidos, muestran que los niveles de LDH medidos en ambas fuentes de macrófagos fueron similares en todos los tratamientos, indicando que la reducción en la carga parasitaria bajo

el pretratamiento con los diferentes inhibidores no fue provocada por la toxicidad de los fármacos utilizados (Figura 15-C). A esto último, se suman reportes previos donde se demuestra que la rapamicina, LY294002 y PP242 (en las concentraciones experimentales) no afectan de manera directa la replicación ni la sobrevivencia del *T. cruzi* (108).

A



B



C

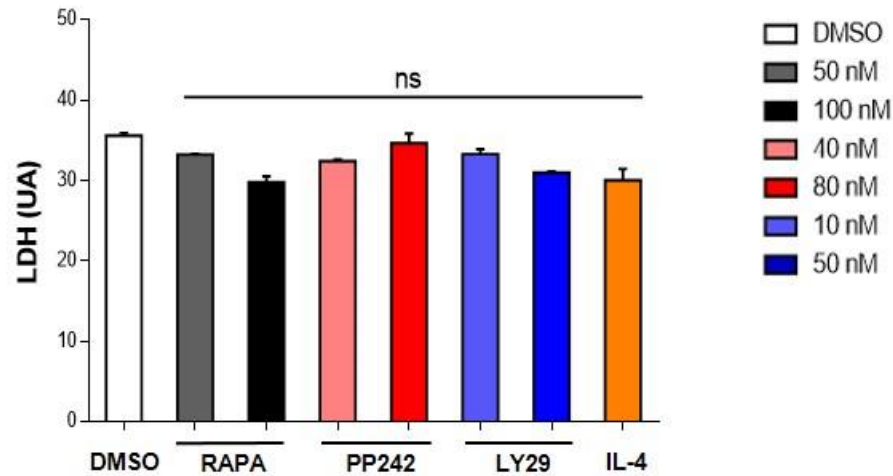
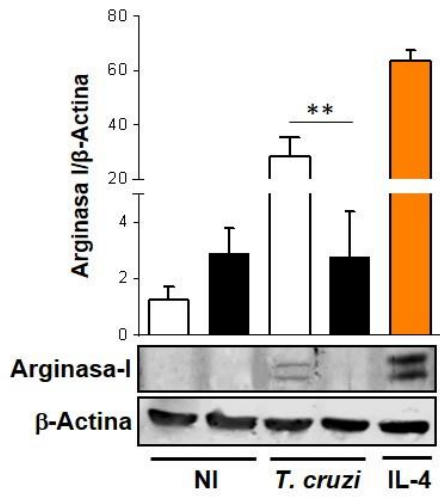


Figura 15 | La activación de mTOR en los macrófagos es esencial para la replicación del parásito. (A-B) Macrófagos derivados de medula ósea (MDMO) y peritoneales de ratones BALB/c fueron pretratados con DMSO (como control), o fueron pretratados con diferentes inhibidores de mTOR: rapamicina (50 o 100 nM), PP242 (40 u 80 nM), LY294002 (10 o 50 nM) durante 90 min. A continuación todas las condiciones fueron lavadas e infectadas con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos) durante 24 h. Además se utilizaron macrófagos sin pretratamiento, estimulados con IL-4 (80 nM) e infectados con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos) durante 24 h, como control positivo de la infección. Luego, todos los parásitos no internalizados fueron lavados, y todos los macrófagos cultivados en RPMI SBF 10%. Después de un total de 72 h fueron preparados para inmunofluorescencia indirecta. (A) Los resultados se expresan como número de parásitos por 100 células, cuantificados por el software ImageJ. Las barras representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes (** p <0,005 respecto al DMSO; *** p <0,001 respecto al DMSO). (B) Una imagen representativa de BMDM pretratados con DMSO o con rapamicina donde se muestra el núcleo celular teñido con DAPI (azul) y a los amastigotes teñidos con IgG-FITC (verde). Los recuadros muestran un área de la imagen aumentada (punta de flecha), indicando macrófagos infectados. (C) La liberación de LDH en los sobrenadantes de cada condición fue utilizada como marcador de muerte celular. Las barras representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes (ns, no significativo respecto al DMSO).

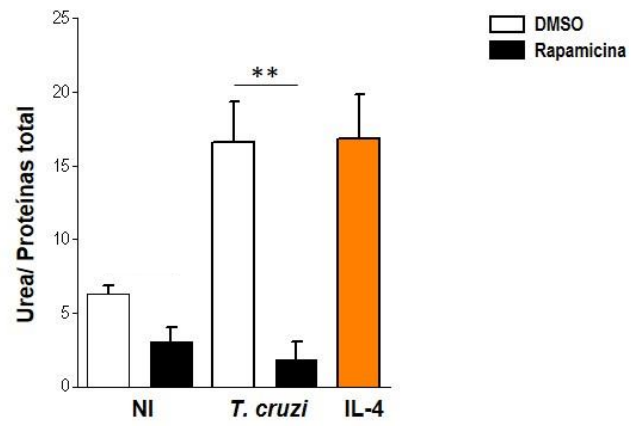
5.1.3 mTOR y el balance iNOS/Arginasa durante la infección con *T. cruzi*

Teniendo presente estos experimentos dónde se observa que la actividad de la vía de mTOR es fundamental para la sobrevivencia del *T. cruzi*, nuestro siguiente objetivo fue evaluar el efecto de la inhibición de esta vía, sobre el balance iNOS/Arginasa (marcadores de polarización), en macrófagos infectados con el parásito. Utilizando nuestro modelo de inhibición, MDMO fueron pretratados con rapamicina y posteriormente infectados. Como controles positivos MDMO fueron estimulados con LPS/IFN γ o IL-4.

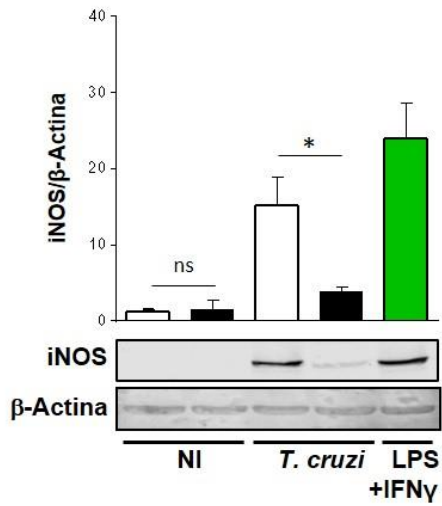
A



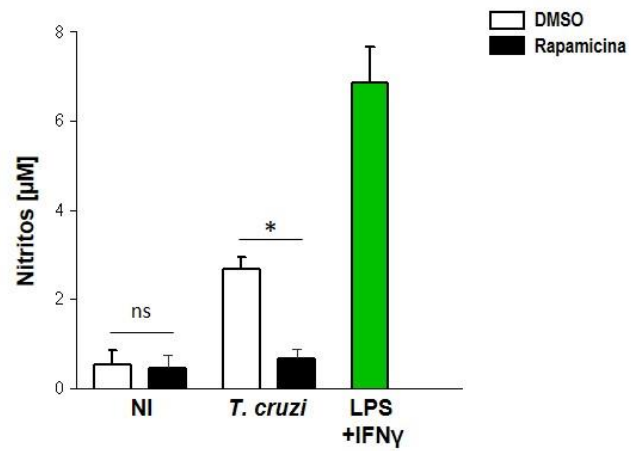
B



C



D



E

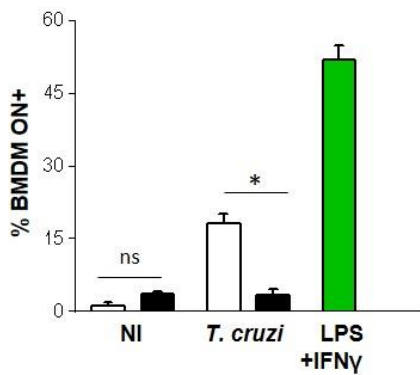


Figura 16 | La inhibición de mTOR modifica la relación iNOS/Arg de MDMO infectados con *T. cruzi*. Macrófagos derivados de medula ósea (MDMO) obtenidos de ratones BALB/c fueron pretratados con DMSO (como control), o fueron pretratados con rapamicina (100 nM) durante 90 min. A continuación todas las condiciones fueron lavadas y cultivadas sin infección (NI, no infectados), o infectadas con *T. cruzi* 1:5, células: parásitos, durante 24 h. Además se utilizaron macrófagos sin pretratamiento y sin infección, estimulados con IL-4 (80 nM) o con LPS (1 µg/mL) +IFN γ (100 ng/mL) durante 24 h, como controles positivos. Después de 24 h p.i. las células y los sobrenadantes fueron recolectados y procesados para diferentes técnicas. Los lisados celulares se utilizaron para evaluar la expresión de (A) Arginasa I e (C) iNOS mediante western blot, usando β -actina como control de carga. El análisis densitométrico se obtuvo utilizando el software ImageJ; los WB representan un experimento de tres experimentos independientes. (B) La actividad de la arginasa se determinó a partir de la producción de urea 24 h p.i. (D) El ON se determinó mediante la reacción de Griess en sobrenadantes, y por (E) FACS utilizando la sonda DAF-FM DA (20µM, FITC), 30 min a 37°C. Los resultados muestran el porcentaje de células productoras de ON, F4/80+; CD11b+. Las barras representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes (* p <0.05; ** p <0.005; *** p <0.001 respecto al DMSO; ns, no significativo respecto al DMSO).

Como se observa en la Figura 16, los BMDM infectados con el *T. cruzi* (barras blancas), elevaron significativamente la expresión y actividad de la enzima arginasa, en concordancia con los reportes que demuestran la importancia de esta enzima para la sobrevivencia del parásito. Sin embargo, aquellos macrófagos pretratados con rapamicina (barras negras) e infectados con el parásito, redujeron significativamente la expresión de las enzimas tanto arginasa como iNOS (Figura 16, A y C), respecto a los macrófagos infectados, pero sin pretratamiento. Los efectos de la inhibición sobre la relación de ambas enzimas se correspondieron con la disminución en la actividad de las mismas, ya que como se observa en la Figura 16, B y D, las concentraciones de urea y NO fueron significativamente menores a los niveles observados en aquellos macrófagos infectados pero sin pretratamiento. Para complementar este análisis, además de medir el ON liberado en sobrenadantes de cultivo, se determinaron sus niveles citoplasmáticos en los lisados celulares a través de FACS (Figura 16, D y E). Al igual que las observaciones obtenidas en sobrenadantes, los niveles de ON citoplasmático se encontraron significativamente disminuidos en macrófagos pretratados con rapamicina e infectados con el parásito, respecto a los controles sin pretratamiento. Estas observaciones demuestran que los circuitos que involucran a la iNOS y a la arginasa disminuyen su expresión durante la inhibición de mTOR.

5.1.4 La relación y el balance de IL-10/IL-12p70 y mTOR durante la infección con *T. cruzi*

Para continuar con nuestro estudio, se determinó la producción de las citoquinas IL-12p70 e IL-10, ambos marcadores de polarización M1 y M2, respectivamente (Figura 17, A y B). Para ello, MDMO fueron pretratados con rapamicina y luego infectados con tripomastigotes de *T. cruzi*. Los sobrenadantes se recolectaron 24 p.i., y luego se procesaron para ELISA. Los resultados de estos experimentos mostraron que aquellos macrófagos pretratados con rapamicina e infectados con el parásito disminuyeron significativamente los niveles de producción de IL-10, respecto a los macrófagos infectados, pero sin pretratamiento. En estos últimos se observó un aumento significativo de la producción de IL-10, mientras que se observó una disminución significativa de la producción de IL-12p70. Trabajos previos al respecto (49, 60, 61, 82, 109), demuestran que la disminución en los niveles de la IL-12p70 funciona como un mecanismo complementario de polarización que ejerce el *T. cruzi* para promover su replicación. Sin embargo, en macrófagos infectados con el parásito y pretratados con rapamicina, los niveles de IL-12p70 aumentaron significativamente, indicando que la inhibición de la vía de mTOR podría estar modificando la polarización inducida por el *T. cruzi* hacia un fenotipo inflamatorio. Estos resultados demuestran que la vía de mTOR es fundamental para la replicación del parásito no solo porque su inhibición reduce significativamente la carga parasitaria, sino también por la inducción de marcadores M1 como la IL-12p70.

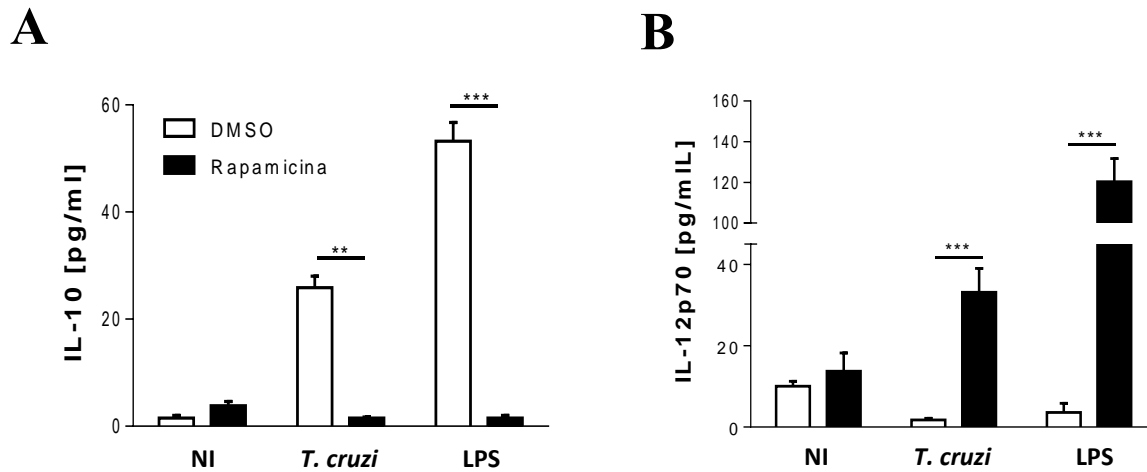


Figura 17 | La inhibición de mTOR modifica el balance IL-10/IL-12 en MDMO infectados con *T. cruzi*. Macrófagos derivados de medula ósea (MDMO) obtenidos de ratones BALB/c fueron pretratados con DMSO (como control), o fueron pretratados con rapamicina (100 nM) durante 90 min. A continuación todas las condiciones fueron lavadas y cultivadas sin infección (NI, no infectados) o infectadas con (*T. cruzi*) 1:5, células: parásitos, durante 24 h. Además se utilizaron macrófagos pretratados con DMSO (como control), o pretratados con rapamicina (100 nM) durante 90 min., los cuales luego de ser lavados fueron estimulados con LPS (1 µg/mL) durante 24 h, como control positivo. Los sobrenadantes fueron recolectados 24 h p.i., y luego preparados para la determinación de producción de (A) IL-10 e (B) IL-12p70 a través de ELISA. Las barras representan la media ± DE correspondiente a 3 experimentos independientes (* p < 0.05 respecto al DMSO; *** p < 0.001 respecto al DMSO).

5.2 mTOR y los mecanismos inflamatorios en el macrófago durante la infección con *T. cruzi*

5.2.1 mTOR y la activación inflamatoria del macrófago durante la infección con el *T. cruzi*

Es ampliamente conocido que el macrófago cumple un rol fundamental en la respuesta inmune contra el *T. cruzi* induciendo mecanismos de comunicación celular a través de citoquinas como IL-12p70, así como también, mecanismos antimicrobianos, como la producción de ON. En nuestro modelo de inhibición de mTOR, los resultados mostraron que el macrófago fue capaz de reducir significativamente la replicación del parásito de forma independiente a la inducción de iNOS. Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue evaluar los posibles circuitos inflamatorios alternativos que pudieran estar participando en este evento.

Teniendo en cuenta que la autofagia es un conocido mecanismo inmune inducido por la inhibición de mTOR, el primer objetivo de esta segunda parte fue el de evaluar la posible participación de la autofagia en la reducción de la carga parasitaria. Previamente ha sido reportado que el pretratamiento durante 24 h con rapamicina induce la activación de autofagia (36, 110-112). Por tal motivo, MDMO fueron pretratados con rapamicina durante 90 min, según indica nuestro modelo de inhibición, y también con rapamicina y PP242 durante 24 h como control positivo de autofagia. Posteriormente fueron procesados para WB con el fin de determinar la expresión de LC3 I/II, un marcador de activación de esta vía de señalización. Como se observa en estos resultados (Figura 18), hubo un aumento en la expresión de las moléculas LC3 I/II en aquellos macrófagos pretratados con rapamicina y PP242 durante 24 h. Por otro lado, en aquellos macrófagos pretratados con rapamicina durante 90 min de acuerdo a nuestro modelo de inhibición, la expresión de la forma LC3 II no fue detectada. Estos resultados estarían indicando que el efecto de la inhibición de mTOR sobre la carga parasitaria, podría estar ocurriendo independientemente a la activación de la autofagia. Otro de los mecanismos evaluados fue aquel que involucra la producción de las especies reactivas del oxígeno citoplasmáticas (cROS), cuya actividad microbicida es uno de los principales mecanismos inflamatorios del macrófago. Para ello, MDMO fueron pretratados DMSO o con rapamicina durante 90 min. Posteriormente fueron lavados y cultivados sin infección o infectados con *T. cruzi*, mientras que otros MDMO sin pretratamiento, fueron estimulados con LPS/IFN γ como control positivo. Las células fueron recolectadas a diferentes tiempos (6 y 24 h p.i.), y luego procesadas para citometría. Una observación acerca de estos experimentos fue que el *T. cruzi* solo no fue capaz de inducir la producción de cROS en macrófagos sin pretratamiento (Figura 19). Este resultado estaría indicando un posible mecanismo de evasión del parásito que le permitiría sobrevivir dentro del citoplasma celular. Sin embargo, la

producción de cROS en aquellos macrófagos pretratados e infectados con el parásito, mostró niveles similares respecto a los observados en macrófagos infectados sin pretratamiento. En su conjunto, los resultados demuestran que tanto la infección con *T. cruzi* como la inhibición de la vía mTOR, no fueron capaces de inducir un aumento en la producción de cROS. Reportes previos han indicado que la actividad de la enzima Indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) del macrófago, participa en el control de la replicación del parásito. Esta enzima, a través del catabolismo del aminoácido triptófano, genera metabolitos como la 3-hidroxiquinurenina (3-HK) cuyos efectos microbicidas se observaron tanto en las formas amastigotes, como tripomastigotes (70, 71).

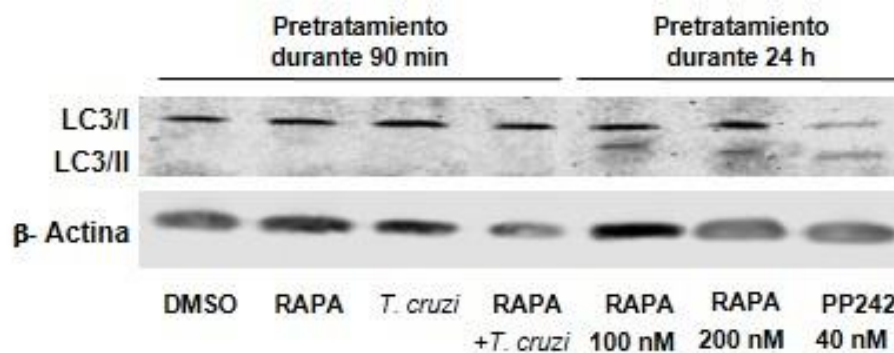


Figura 18 | La disminución de la carga parasitaria durante la inhibición de mTOR ocurrió de forma independiente a la inducción de autofagia en MDMO. Macrófagos derivados de medula ósea (MDMO) de ratones C57BL/6, fueron pretratados con DMSO (como control) o con rapamicina (100 nM), según se indica, durante 90 min. A continuación todas las condiciones fueron lavadas y cultivadas sin infección o infectadas con *T. cruzi* 1:5, células: parásitos, durante 24 h. Como control positivo de autofagia, MDMO, fueron pretratados con rapamicina (RAPA 100 nM y 200 nM) o con PP242 (40 nM) durante 24 h. Posteriormente, todos los macrófagos fueron lavados y preparados para la determinación de la expresión de las formas LC3 I y II, medida a los 90 min y 24 h a través de WB. Para ello se utilizó como control de carga β-actina. El WB muestra 1 experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Dado que la señalización a través de la enzima IDO forma parte de la batería de circuitos inflamatorios disponibles en el macrófago, nuestro siguiente objetivo fue determinar si la inhibición de la vía mTOR involucra la activación de esta enzima. Para ello, nuestro modelo de inhibición consistió en BMDM pretratados durante 24 h con el inhibidor de la enzima IDO, el 1-MT, y luego durante 90 min, con rapamicina. Después del lavado, los macrófagos fueron infectados con *T. cruzi*, o estimulados con IL-4 o LPS/IFN γ como controles positivos, y posteriormente procesados para IF.

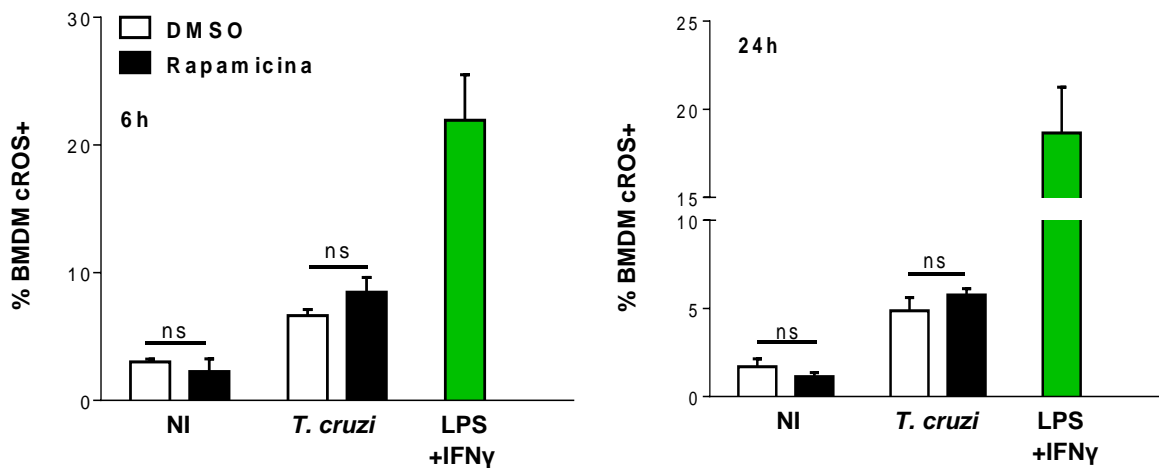
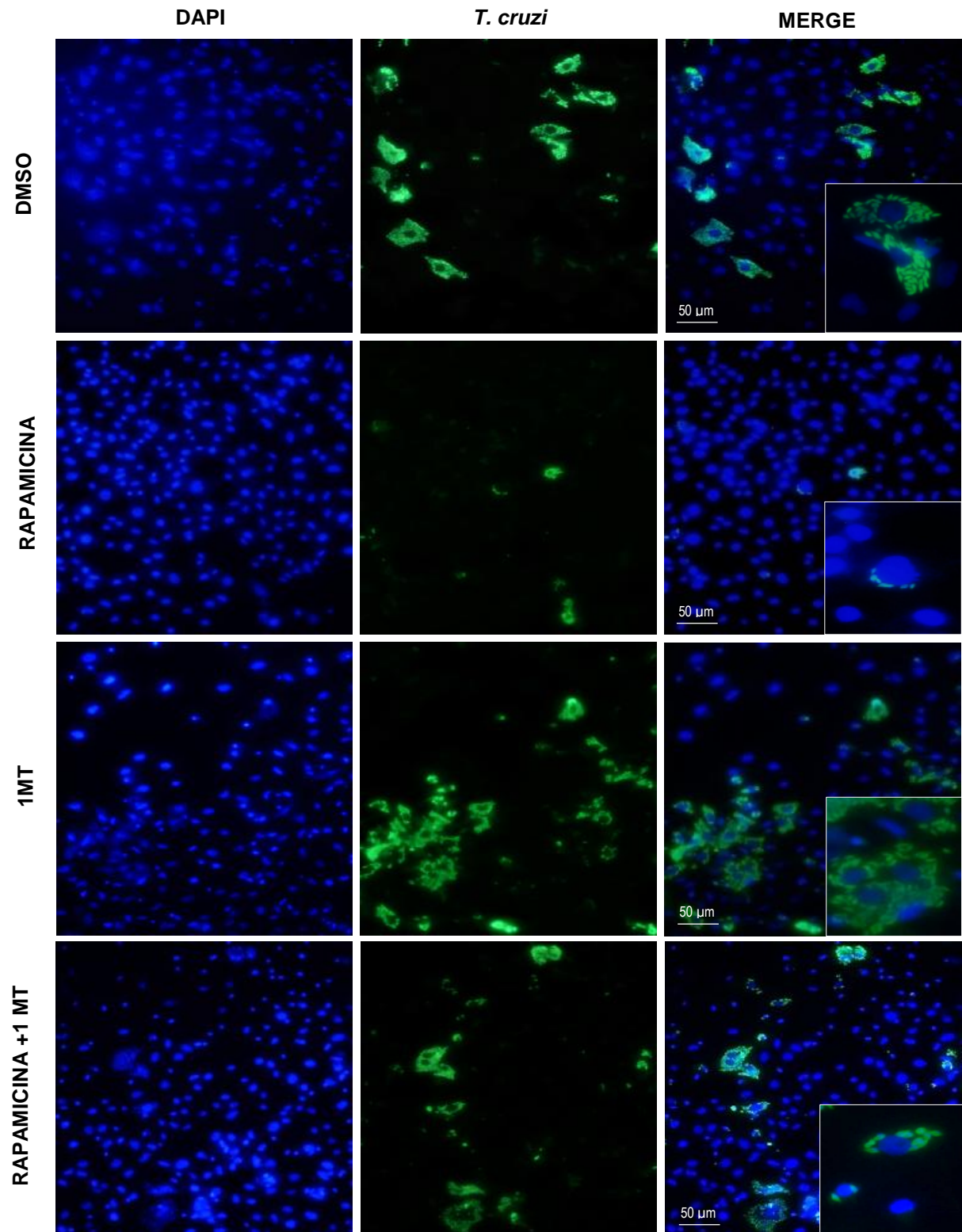


Figura 19 | El descenso de la carga parasitaria durante la inhibición de mTOR es independiente a la vía de ROS citoplasmático (cROS). MDMO obtenidos a partir de ratones BALB/c, fueron pretratados con rapamicina (100 nM) o con DMSO, (control), durante 90 min. Luego todas las condiciones fueron lavadas y cultivadas sin infección (NI, no infectados) o infectadas con *T. cruzi* 1:5, células: parásitos durante 6 y 24 h. Además se utilizaron macrófagos sin pretratamiento y sin infección, estimulados con LPS (1 μ g/mL) + IFN γ (100 ng/mL) durante 24 h, como controles positivos. A continuación las células fueron recolectadas y procesadas para su marcación con anti F4/80 (PE) y CD11b (APC). Después fueron incubadas con la sonda 20 μ M H2DCFDA (oxidada por peróxido de hidrogeno; FITC) durante 20 min a 37°C para la determinación de las especies reactivas del oxígeno citoplasmáticas (cROS). Los resultados fueron procesados a través del software FlowJo, y son expresados como porcentaje de células positivas. Las barras muestran la media \pm DE del análisis densitométrico correspondiente a 3 experimentos independientes (ns, no significativo respecto al DMSO).

A



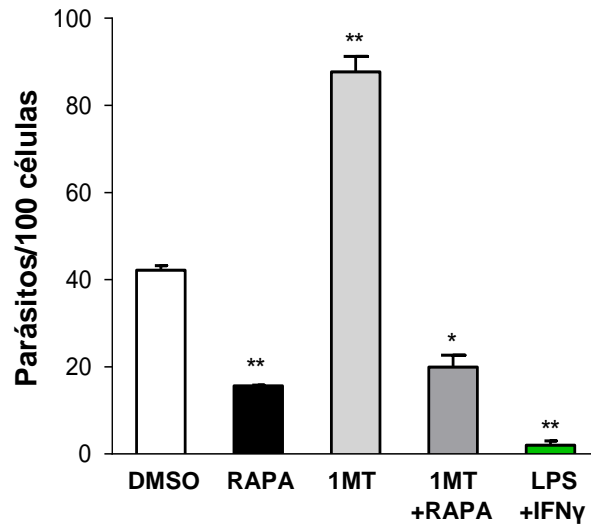
B

Figura 20 | El descenso de la carga parasitaria durante la inhibición de mTOR ocurrió de forma independiente a la vía de IDO. MDMO obtenidos a partir de ratones BALB/c, fueron pretratados con DMSO como control, con rapamicina (100 nM) durante 90 min., con 1-Metil-DL-triptofano (1- MT, 100 μ M) durante 24 h, o con 1-MT (24 h) + rapamicina (90 min). A continuación todas las condiciones fueron lavadas e infectadas con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos) durante 24 h. Además se utilizaron macrófagos sin pretratamiento, estimulados con LPS (1 μ g/mL) + IFN γ (100 ng/mL) e infectados con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos) durante 24 h como control positivo. Luego, todos los parásitos no internalizados fueron lavados, y todos los macrófagos cultivados en RPMI 10% SBF. Después de un total de 72 h fueron preparados para inmunofluorescencia indirecta. (A) Micrografía representativa de MDMO pretratados con DMSO, con rapamicina, con 1-MT, o con rapa + 1- MT, donde se observan los núcleos celulares teñidos con DAPI (azul), y a los amastigotes teñidos con IgG-FITC (verde), incubados con un pool de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas y un anticuerpo secundario anti IgGh conjugado con FITC. Los cuadros muestran un área de la micrografía (flechas) a mayor magnificación, e indican macrófagos infectados. (B) Las barras representan la replicación intracelular del *T. cruzi* en MDMO, expresada como número de parásitos/100 células, y representan la media \pm DE correspondiente a 3 experimentos independientes (* p <0.05 respecto al DMSO; ** p <0.005 respecto a DMSO).

Todas las inmunofluorescencias fueron analizadas teniendo en cuenta el número de células infectadas, así como también el número de amastigotes dentro de cada célula (Figura 20-A). En estos resultados podemos observar en principio, una corroboración de los reportes previamente comentados, en los que la participación de la enzima IDO frente a la infección contra el *T. cruzi* es fundamental para el control de la infección. Como se observa (Figura 20 B), aquellos macrófagos control pretratados con 1MT, fueron incapaces de reducir la replicación del parásito, señalando la importancia de esta vía para el control y eliminación de microorganismos. En

contraste, se observó que aquellos macrófagos en los que la vía de mTOR se encontraba inhibida, fueron capaces de reducir significativamente la replicación del parásito comparado con los controles sin pretratamiento. Por último, los macrófagos infectados donde se llevó a cabo la inhibición deIDO y mTOR, redujeron la replicación del parásito comparado con los pretratados solamente con el 1MT. En conclusión, este grupo de resultados indican que la inhibición de mTOR y su efecto sobre la carga parasitaria, estaría ocurriendo a través de mecanismos inflamatorios independientes a la activación deIDO.

5.2.2 El macrófago y los mecanismos que participan del fenotipo M1

Además de ser una célula fundamental para la inmunovigilancia de los tejidos ante distintos escenarios infecciosos, el macrófago tiene la habilidad de inducir determinados mecanismos inflamatorios que le permiten adaptar las respuestas inmunes a diferentes grupos de microorganismos. Con el objeto de determinar cuál es el mecanismo inflamatorio que estaría activándose durante la inhibición de mTOR, llevamos a cabo un estudio de diferentes moléculas y mediadores inflamatorios importantes para la defensa contra el *T. cruzi*. Para ello se emplearon diferentes cepas de ratones KO para diferentes moléculas inflamatorias en el macrófago. Sin embargo, todos los ratones KO que fueron empleados fueron obtenidos a partir de ratones de *background* C57BL/6, por lo que fue necesario reproducir los mismos resultados de nuestro modelo de inhibición con rapamicina, observados en ratones con *background* BALB/c. Para ello MDMO de la cepa C57BL6 fueron pretratados con rapamicina durante 90 min y luego infectados con *T. cruzi*. Además, MDMO fueron estimulados con IL-4 o LPS+IFN γ como controles positivos. Posteriormente, los sobrenadantes fueron recolectados a diferentes tiempos (24 h) y procesados para ELISA con el objetivo de evaluar el balance IL-10/IL-12, o procesados para la determinación de nitritos a través de la reacción de Griess (Figura 21).

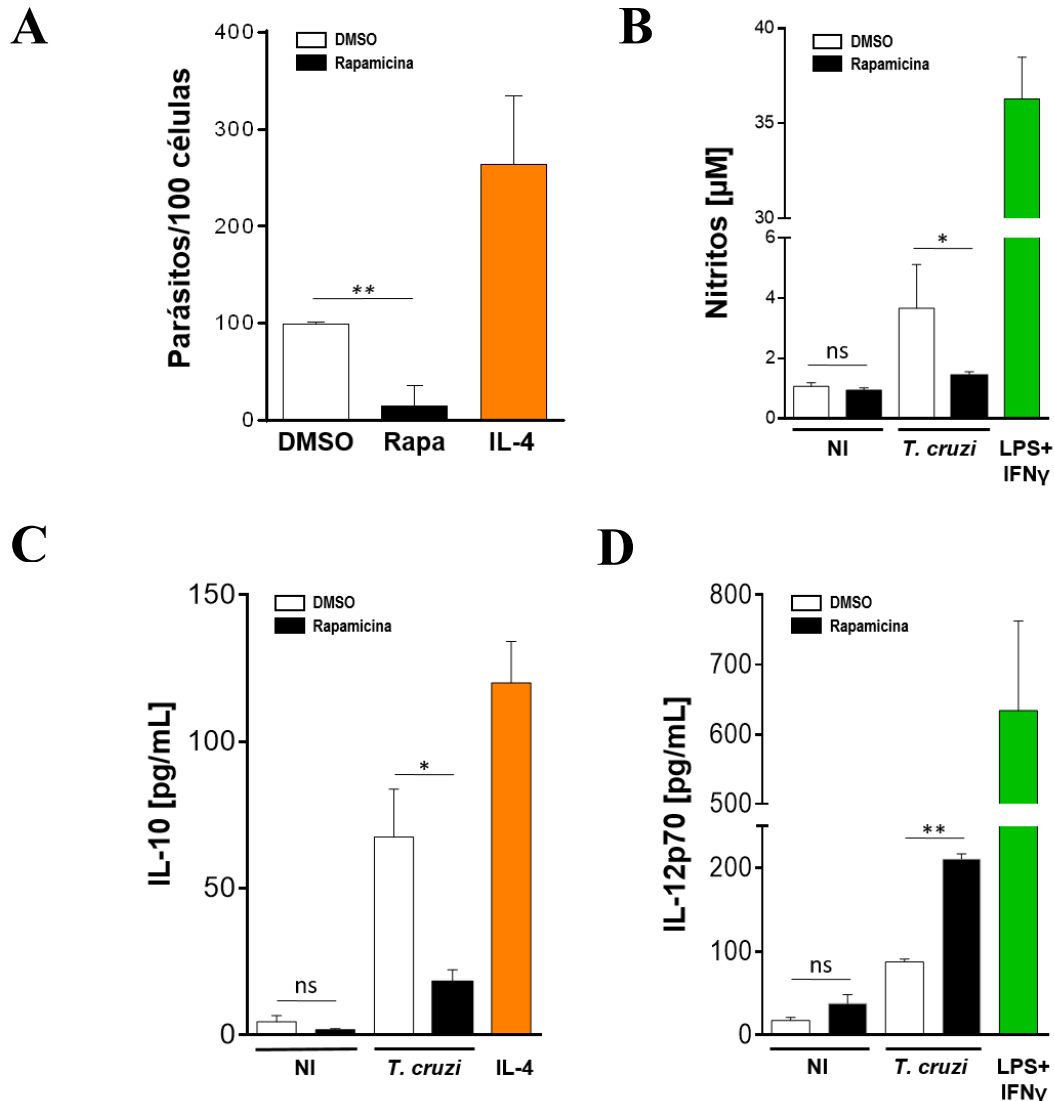


Figura 21 | La inhibición de mTOR en MDMO de cepa BALB/c fue reproducida en MDMO de la cepa C57BL/6. (A) Macrófagos derivados de medula ósea (MDMO) obtenidos de ratones C57BL/6, fueron pretratados con DMSO como control, o con rapamicina (100 nM) durante 90 min. A continuación todas las condiciones fueron lavadas e infectadas con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos) durante 24 h. Además se utilizaron macrófagos sin pretratamiento, estimulados con IL-4 (80 nM) e infectados con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos) durante 24 h como control positivo de la infección. Luego, todos los parásitos no internalizados fueron lavados, y todos los macrófagos cultivados en RPMI SBF10%. Después de un total de 72 h fueron preparados para inmunofluorescencia indirecta. Las barras representan la replicación intracelular del *T. cruzi*, expresada como número de parásitos / 100 células y representan la media \pm DE correspondiente a n=3 experimentos independientes (* $p < 0.05$ respecto al DMSO; ** $p < 0.001$ respecto a DMSO). (B-D) Macrófagos derivados de medula ósea (MDMO) obtenidos de ratones C57BL/6 fueron pretratados con DMSO (control), o con rapamicina (100 nM) durante 90 min. A continuación todas las condiciones fueron lavadas y cultivadas sin infección (NI, no infectados), o infectadas con *T. cruzi* 1:5, células: parásitos, durante 24 h. Además se utilizaron macrófagos sin pretratamiento y sin infección, estimulados con IL-4 (80 nM) o con LPS (1 μ g/mL) +IFN γ (100 ng/mL) durante 24 h, como controles positivos. Después de 24 h los sobrenadantes fueron recolectados para la determinación del ON a través de la reacción de Griess (B), o para la determinación de la producción de IL-10 (C) e IL-12p70 (D) a través de ELISA. Las barras representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; respecto al DMSO).

En una primera instancia, estos resultados confirman nuestro modelo de inhibición de mTOR en los macrófagos C57BL/6, ya que como se observa aquellos macrófagos pretratados con rapamicina fueron capaces de reducir significativamente la carga parasitaria respecto a los controles sin pretratamiento (Figura 21). Además, los MDMO sin pretratamiento e infectados con *T. cruzi* elevaron significativamente la producción de IL-10 respecto aquellos macrófagos sin infección.

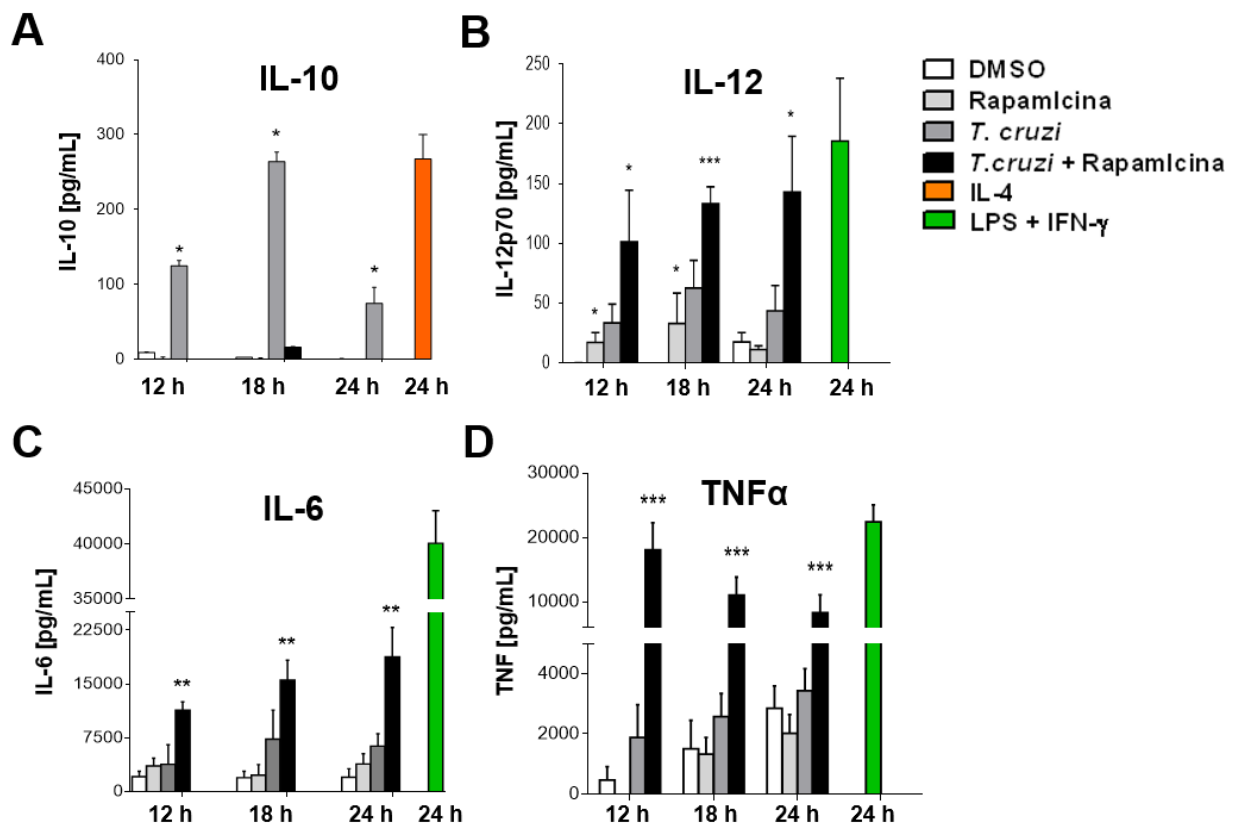


Figura 22 | La inhibición de la vía de mTOR modula la producción de citoquinas inflamatorias/regulatorias en MDMO infectados con *T. cruzi*. Macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) obtenidos de ratones C57BL/6 fueron pretratados con DMSO (como control), o fueron pretratados con rapamicina (100 nM) durante 90 min. A continuación todas las condiciones fueron lavadas y cultivadas sin infección, o infectadas con *T. cruzi* 1:5, células: parásitos, durante 12, 18 y 24 h. Además se utilizaron macrófagos sin pretratamiento y sin infección, estimulados con LPS (1 μ g/mL) +IFN γ (100 ng/mL) durante 24 h, como controles positivos. Después de 24 h los sobrenadantes fueron recolectados para la determinación de la producción de (A) IL-10, (B) IL-12p70, (C) IL-6 y (D) TNF α a través de ELISA. Las barras representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$; respecto al DMSO).

En contraste, el tratamiento con rapamicina promovió un descenso en la producción de IL-10, mientras que la producción de IL-12 aumento significativamente, de acuerdo a las observaciones en la cepa BALB/c. La corroboración de nuestro modelo de inhibición en la cepa C57BL/6, también fue confirmada a través de la determinación de la actividad de la enzima iNOS, en los cuales la inhibición con rapamicina redujo significativamente la expresión y actividad de esta enzima. Además, como se observa en la Figura 10-B, el efecto de la rapamicina promovió un descenso en la producción de ON respecto aquellos sin pretratamiento.

Una vez confirmado nuestro modelo experimental y nuestras observaciones en MDMO de la cepa C57BL/6, continuamos con el estudio de mecanismos inflamatorios inducidas por la inhibición de mTOR. Para ello MDMO fueron pretratados con rapamicina durante 90 min y luego infectados con *T. cruzi*. Además, MDMO fueron estimulados con IL-4 o LPS/IFN γ como controles positivos. Posteriormente, los sobrenadantes fueron recolectados a diferentes tiempos (12, 18 y 24 h) y procesados para ELISA con el objetivo cuantificar citoquinas inflamatorias. Los resultados mostraron que, además del aumento significativo en la producción de IL-12p70, en los macrófagos pretratados e infectados (Figura 22-A) la producción de TNF α e IL-6 (Figura 22, B y C) aumentó significativamente respecto al control sin pretratamiento. Posteriormente, las células fueron preparadas para IF indirecta 72 h p.i. Todas las IF fueron analizadas teniendo en cuenta el número de células infectadas, así como también el número de amastigotes dentro de cada célula. De esta forma, en ausencia de alguna de estas moléculas inflamatorias, el macrófago sería incapaz de responder al pretratamiento con rapamicina, y por tanto, controlar la carga parasitaria. Para ello, se llevó a cabo nuestro modelo de inhibición en los que MDMO KO y WT, fueron pretratados con rapamicina durante 90 min y luego infectados con *T. cruzi*. Además, MDMO fueron estimulados con IL-4 o LPS/IFN γ como controles positivos (Figura 23). Estos datos, complementan las

observaciones previas en las cuales se indica que el estado inflamatorio producido por la inhibición de mTOR, estaría permitiendo al macrófago controlar al parásito. Para continuar con nuestros objetivos el estudio de diferentes moléculas involucradas en las vías inflamatorias se completó utilizando cepas de ratones KO TNF α -R, IFN α -R, IL-6, CASP1/11 y NLRP3. En la figura 24 se observa que tanto los MDMO WT como los MDMO IFN α -R-KO y CASP1/11-KO pretratados con rapamicina, fueron capaces de controlar significativamente la carga parasitaria respecto al control sin pretratamiento. Esto indicaría que los circuitos IFN α -R y CASP1/11, no se activan durante la inhibición de mTOR y, por tanto, el control sobre la replicación del parásito ocurriría independientemente de los mismos. En este mismo sentido, cabe destacar que en experimentos similares (no mostrados) con cepas de ratones TLR2 y TLR4 KO, se observó que dichos mecanismos tampoco fueron activados por la inhibición de mTOR.

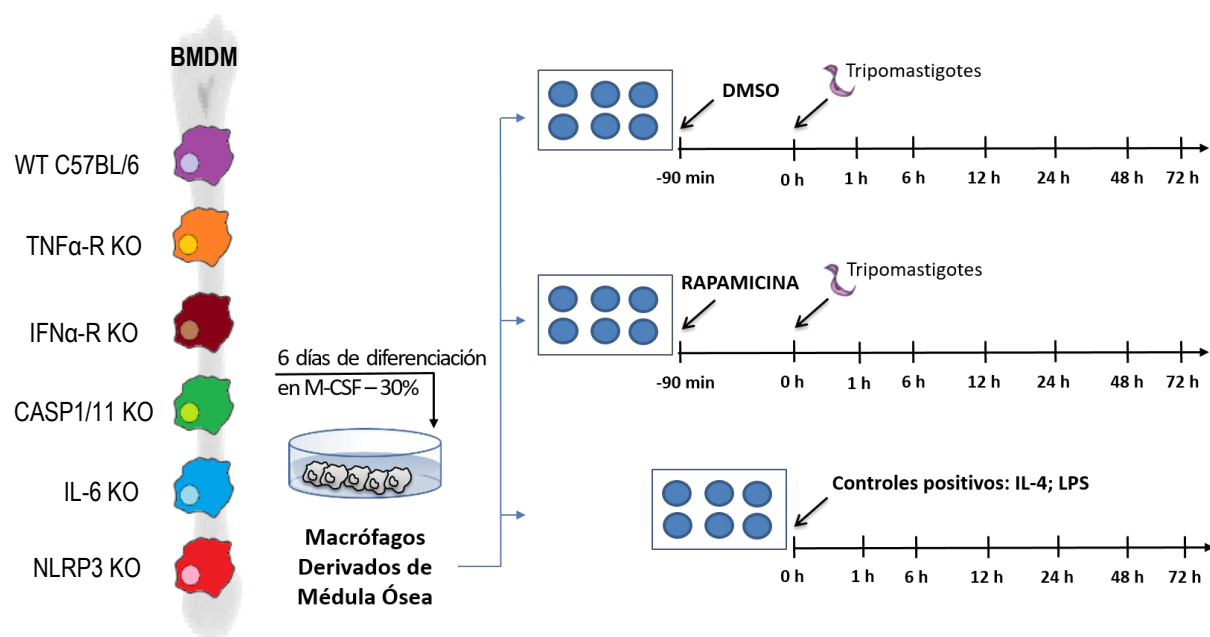
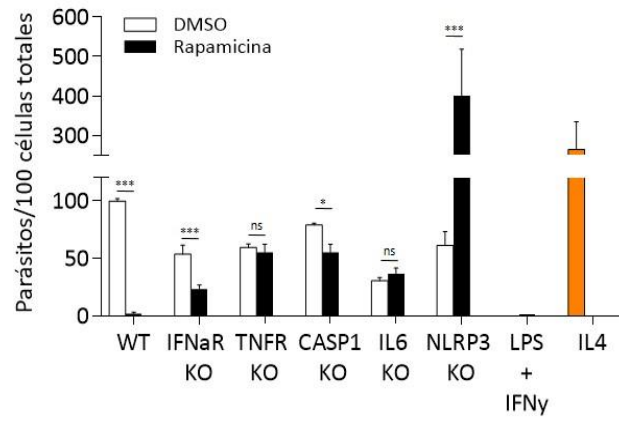
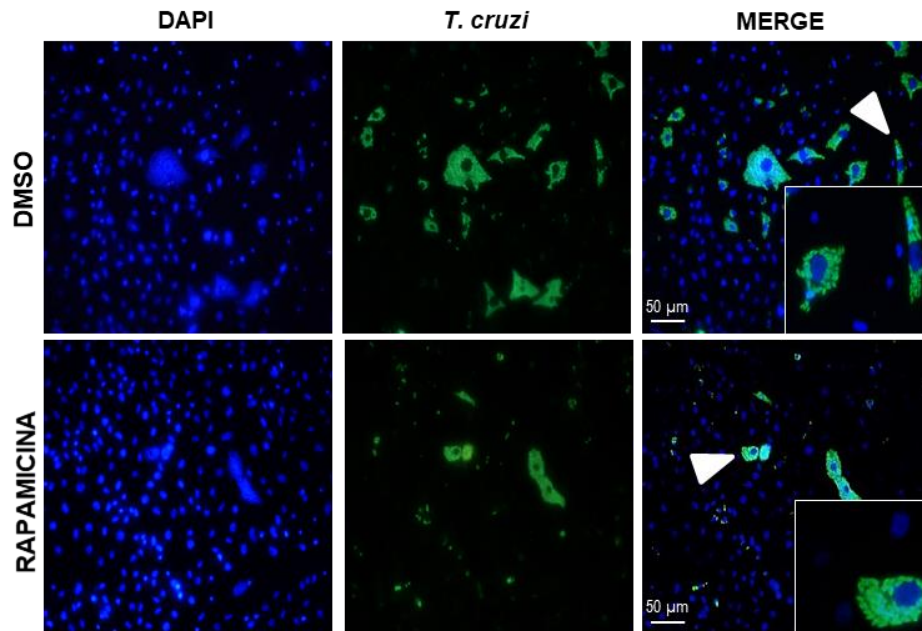


Figura 23 | Modelo de inhibición de la vía de mTOR en cepas KO. MDMO obtenidos a partir de ratones TNF-R KO, IFN α -R KO, CASP1/11 KO, IL-6 KO, NLRP3 KO y WT C57BL/6, fueron pretratados con rapamicina (100 nM) o con DMSO (C, control), durante 90 min. A continuación, fueron lavados infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* (1:5, células: parásitos). BMDM estimulados con IL-4 (80 nM), fueron usados como controles. Finalmente, los macrófagos fueron lavados y preparados para IF.

A



B



C

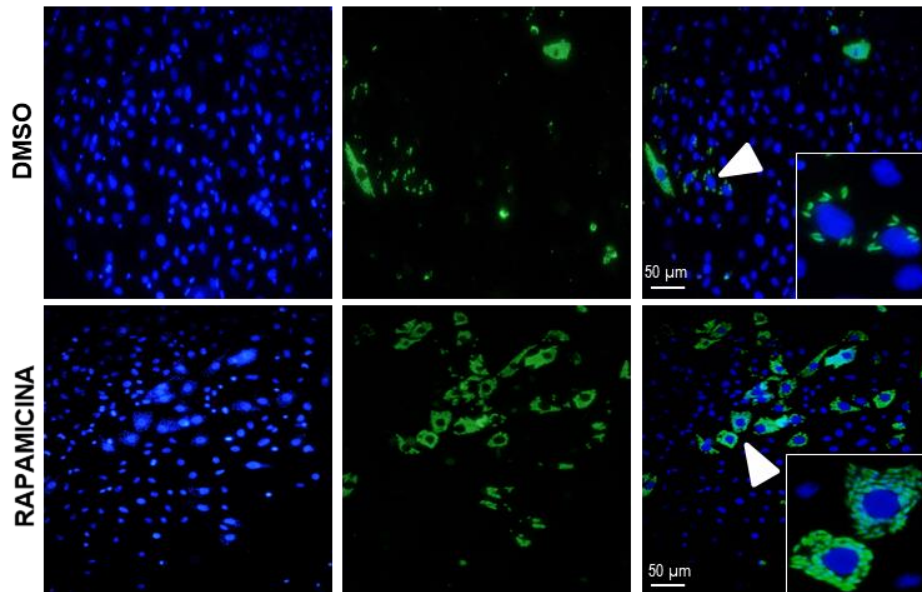


Figura 24 | Efectos sobre la carga parasitaria inducidos por la inhibición de mTOR en diferentes cepas KO infectadas con *T. cruzi*. Macrófagos derivados de medula ósea (MDMO) obtenidos de ratones WT, TNF-R KO, IFN α -R KO, CASP1/11 KO, IL-6 KO, NLRP3 KO con “background” C57BL/6, fueron pretratados con DMSO como control, o con rapamicina (100 nM) durante 90 min. A continuación todas las condiciones fueron lavadas e infectadas con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos) durante 24 h. Además se utilizaron macrófagos sin pretratamiento, estimulados con IL-4 (80 nM) e infectados con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos), o estimulados con LPS (1 μ g/mL) +IFN γ (100 ng/mL) e infectados con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos) durante 24 h como controles positivos. Luego, todos los parásitos no internalizados fueron lavados, y todos los macrófagos cultivados en RPMI SBF10%. Después de un total de 72 h fueron preparados para inmunofluorescencia indirecta. Las barras representan la replicación intracelular del *T. cruzi*, expresada como número de parásitos/100 células, a través del programa imageJ, y representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes (ns, no significativo; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ respecto a DMSO). (B-C) Micrografías representativa de BMDM WT (**B**) y NLRP3-KO (**C**) pretratados con DMSO (control) o rapamicina donde se observan los núcleos celulares teñidos con DAPI, y las formas intracelulares del parásito, incubados con sueros de pacientes con enfermedad de Chagas y un anticuerpo secundario anti IgGh conjugado con FITC. Los cuadros muestran un área de la micrografía (flechas) a mayor magnificación, e indican macrófagos infectados.

En contraste, aquellos macrófagos pretratados con rapamicina, IL-6 o TNF-R KO, no pudieron controlar la carga parasitaria, respecto a sus controles sin pretratamiento. Esto último, estaría indicando que los circuitos vinculados al TNF α y a la IL-6 podrían estar participando durante la inhibición de mTOR. Finalmente, en estos mismos experimentos, aquellos macrófagos NLRP3-KO, pretratados con rapamicina, fueron significativamente incapaces de controlar la carga parasitaria, siendo esta, significativamente mayor respecto a sus controles sin pretratamiento, e incluso, comparada con la de los controles WT sin pretratamiento (Figura 24). Por tanto, aunque las observaciones en macrófagos TNF α -KO e IL-6- KO, señalan estas vías como posibles circuitos inflamatorios activados por la inhibición de mTOR, los valores significativos obtenidos de los macrófagos NLRP3-KO, estarían señalando al inflamasoma, como uno de los principales circuitos que le permiten al macrófago tratado con rapamicina controlar la carga parasitaria.

5.3 mTOR y el inflamasoma durante la infección con *T. cruzi*

5.3.1 El inflamasoma como mecanismo inflamatorio

Teniendo presentes los resultados previos en donde se pudo observar una vinculación entre la inhibición de mTOR y la posible activación del inflamasoma, y considerando los reportes que demuestran que el macrófago es capaz de activar dicho mecanismo frente a la infección con *T. cruzi*, nuestro siguiente objetivo fue profundizar los estudios que nos permitan demostrar la activación del inflamasoma (113, 114). Para ello, se llevó a cabo la medición de 2 componentes de este circuito inflamatorio: el receptor intracelular NLRP3 y la IL-1 β , un marcador de activación de inflamasoma. De acuerdo a nuestro modelo de inhibición, MDMO fueron pretratados con rapamicina durante 90 min, lavados, y luego infectados con tripomastigotes de *T. cruzi*. Además, MDMO fueron estimulados con LPS / ATP como controles positivos. Posteriormente, los lisados y sobrenadantes fueron recolectados a distintos tiempos (1, 3 y 6 h) para su análisis por Western Blot y ELISA. Como se observa en este grupo de resultados (Figura 25), aquellos macrófagos pretratados e infectados, aumentaron significativamente la expresión del receptor NLRP3 respecto a sus controles infectados sin pretratamiento. En línea con este resultado, fue demostrado que los macrófagos en las mismas condiciones también eran capaces de aumentar significativamente la expresión de IL-1 β en los sobrenadantes. Este resultado estuvo en concordancia con lo obtenido por ELISA, en donde se observó que aquellos macrófagos pretratados e infectados, aumentaron significativamente la producción de IL-1 β a las 3 y 6 h p.i. En conjunto, estos datos indicarían que la inhibición de mTOR durante la infección con el *T. cruzi* estaría modulando el ensamblaje del inflamasoma, así como también su activación. Este fenómeno le estaría permitiendo al macrófago inducir el estado inflamatorio en el que se expresan citoquinas como IL-12p70 y el TNF α , y por lo tanto controlar significativamente la carga parasitaria.

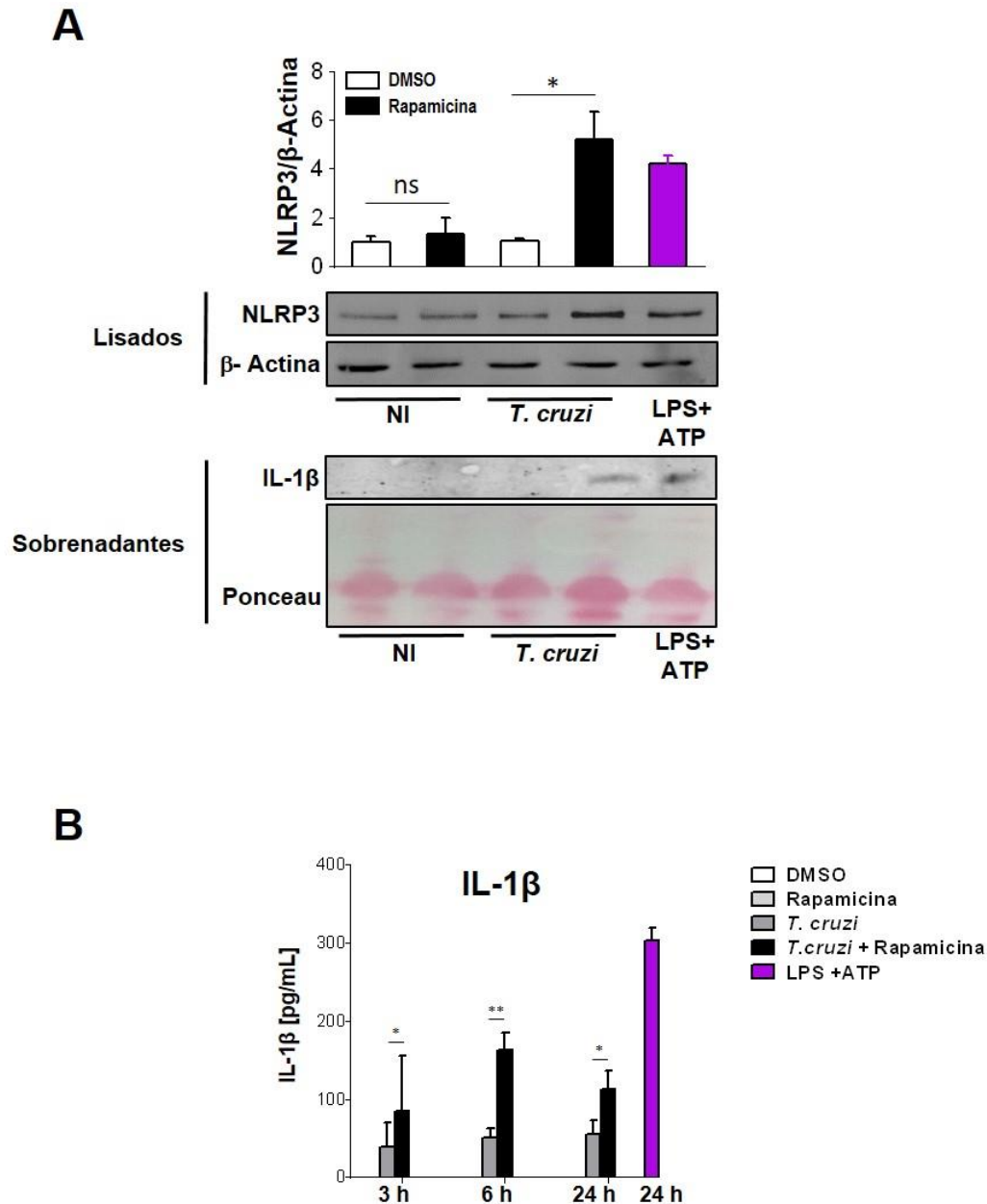


Figura 25 | La inhibición de mTOR indujo un aumento del receptor NLRP3 y en la producción de IL-1 β durante la infección con el *T. cruzi*. (A-B) Macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) obtenidos de ratones C57BL/6 fueron pretratados con DMSO (control), o con rapamicina (100 nM) durante 90 min. A continuación todas las condiciones fueron lavadas y cultivadas sin infección (NI, no infectados), o infectadas con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos). Además, se utilizaron macrófagos sin pretratamiento y sin infección, estimulados con LPS (1 μ g/mL) + ATP (5 mM) como controles positivos. Posteriormente, los macrófagos fueron lavados y preparados para la determinación de la expresión de NLRP3 e IL-1 β por WB y solo de IL-1 β por ELISA Sandwich. (A) Panel superior, NLRP3 de lisados celulares: el WB corresponden a un experimento representativo, y las barras muestran el análisis densitométrico correspondiente a 3 experimentos independientes (* $p < 0.05$ respecto al DMSO), utilizando β -actina como control de carga. Panel inferior, IL-1 β de sobrenadantes celulares: el WB corresponde a un experimento representativo utilizando rojo ponceau como control de carga. (B) Producción de IL-1 β en sobrenadantes por ELISA. Las barras representan la media \pm DE correspondiente a 3 experimentos independientes (** $p < 0.001$ respecto al DMSO; *** $p < 0.0001$ respecto al DMSO).

5.3.2 *La inhibición de mTOR y el inflammasoma*

Como es sabido en algunos escenarios, la activación del inflammasoma puede involucrar a la mitocondria como plataforma de ensamblaje del inflammasoma para su estructura macromolecular. En nuestras observaciones, esta organela podría estar involucrada aumentando la producción del radical superóxido (mtROS), un potencial mediador microbicida para el parásito. De esta forma nuestro siguiente objetivo fue determinar si la activación del inflammasoma descrita previamente, estaba participando en la inducción de la producción de mtROS, y en consecuencia, del descenso de la carga parasitaria por sus efectos microbicidas. Para ello, y de acuerdo a nuestro modelo de infección, MDMO fueron pretratados con rapamicina durante 90 min y luego infectados con tripomastigotes de *T. cruzi*. Además, MDMO fueron estimulados con LPS/ATP como controles positivos. Posteriormente, a diferentes tiempos p.i. (3 y 6 h) las células fueron marcadas con la sonda MitoSOX y analizadas por FACS. Como se observa en estos resultados (Figura 26), los MDMO pretratados e infectados con el parásito, aumentaron significativamente la producción de mtROS a las 3 y 6 h p.i., respecto a los controles sin pretratamiento. Este resultado sugiere que la activación del inflammasoma durante la inhibición de mTOR podría estar vinculada con el aumento en la producción de mtROS ya que, a los mismos tiempos observados, ambos mecanismos se encontraron activados.

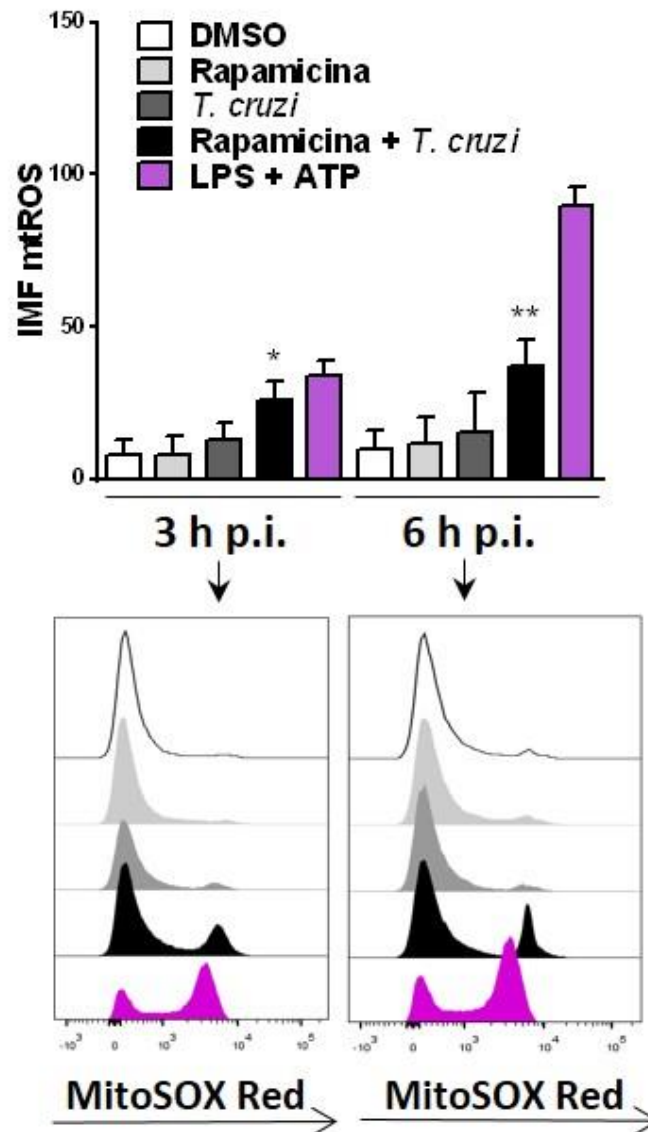
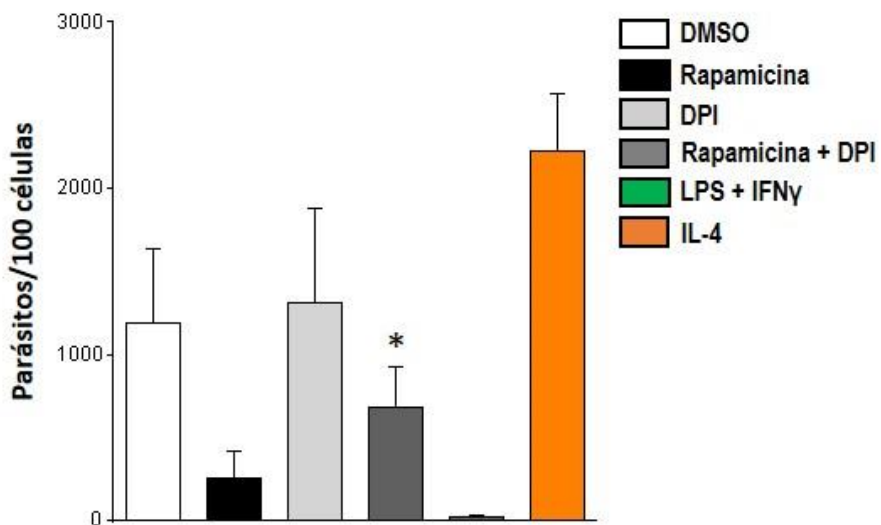


Figura 26 | La producción de mtROS es regulada por la inhibición de mTOR durante la infección con el *T. cruzi*. Macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) obtenidos de ratones C57BL/6 fueron pretratados con DMSO (control) o con rapamicina (100 nM) durante 90 min. A continuación todas las condiciones fueron lavadas y cultivadas sin infección (NI, no infectadas) o infectadas con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos) durante 3 y 6 h. Además se utilizaron macrófagos sin pretratamiento y sin infección, estimulados con LPS (1 µg/mL) + ATP (5mM) como controles positivos. A continuación los MDMO fueron marcados con anti F4/80 (FITC) y CD11b (APC), y luego de ser lavados, fueron incubados con la sonda 5 µM MitoSOX (PE, Red) durante 15 min a 37 °C para la determinación de las especies reactivas del oxígeno mitocondriales (mtROS). Los resultados son expresados como intensidad media de fluorescencia (IMF) utilizando el software FlowJo. Las barras representan la media ± DE correspondiente a 3 experimentos independientes (* p <0.05 respecto al DMSO; ** p <0.001 respecto al DMSO). Los histogramas son representativos de los 3 experimentos independientes.

Para complementar estas observaciones y poner en evidencia la importancia de la activación de mtROS como posible mecanismo inflamatorio, se llevó a cabo el diseño de un nuevo modelo de inhibición. En dicho modelo, además de inducir la inhibición de la vía de mTOR, se produjo la inhibición de la NADPH oxidasa como control, la enzima encargada de la producción de ROS. Para ello MDMO fueron pretratados con el inhibidor de NADPH oxidasa (DPI) durante 3 h, o con DPI y rapamicina durante 3 h y 90 min, respectivamente. Posteriormente, fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi*. Además, MDMO fueron estimulados con IL-4 o LPS/IFN γ como controles positivos. Después de 72 h p.i., los macrófagos fueron preparados para IF (Figura 27). En principio, podemos corroborar nuestro modelo de inhibición, en el que los MDMO pretratados con rapamicina reducen significativamente la carga parasitaria, respecto a los controles sin pretratamiento. Además, se muestra que la inhibición de la NADPH oxidasa por sí sola, no indujo un aumento significativo de la carga parasitaria en BMDM tratados con DPI, respecto a los macrófagos control sin pretratamiento. Sin embargo, MDMO sometidos al pretratamiento con DPI y rapamicina, mostraron una significativa incapacidad para revertir el efecto producido por la inhibición de mTOR sobre la carga parasitaria, cuando se los compara con aquellos MDMO control pretratados sólo con rapamicina.

Para corroborar si efectivamente el pretratamiento con DPI era capaz de inhibir la producción de mtROS en los macrófagos tratados, nuestro siguiente objetivo fue medir los niveles de producción de dicha especie reactiva a través de FACS. Para ello, y de acuerdo a nuestro modelo de infección, MDMO fueron infectados con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos), o pretratados con rapamicina (100 nM, durante 90 min) y luego infectados con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos), o pretratados con DPI (20 μ m; 3 h) y luego infectados con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos), o pretratados con DPI (20 μ m; 3 h) + rapamicina (100 nM, durante 90 min) y luego infectados con

T. cruzi (1:5, células: parásitos). A continuación, todas las condiciones fueron lavadas y cultivadas durante 6 h. Además, se utilizaron macrófagos sin pretratamiento y sin infección, estimulados con LPS (1 µg/mL) + ATP (5 mM) durante 6 h, como controles positivos. Posteriormente, las células fueron marcadas con la sonda MitoSOX y analizadas por FACS. Como se observa en estos resultados (Figura 28), el pretratamiento con DPI (barra gris oscuro) inhibió significativamente la producción de mtROS cuando se la compara con el pretratamiento con rapamicina y la infección con *T. cruzi* (barra negra). Esto estaría indicando que las especies reactivas del oxígeno mitocondriales podrían estar participando en el control de la replicación del *T. cruzi*.

A

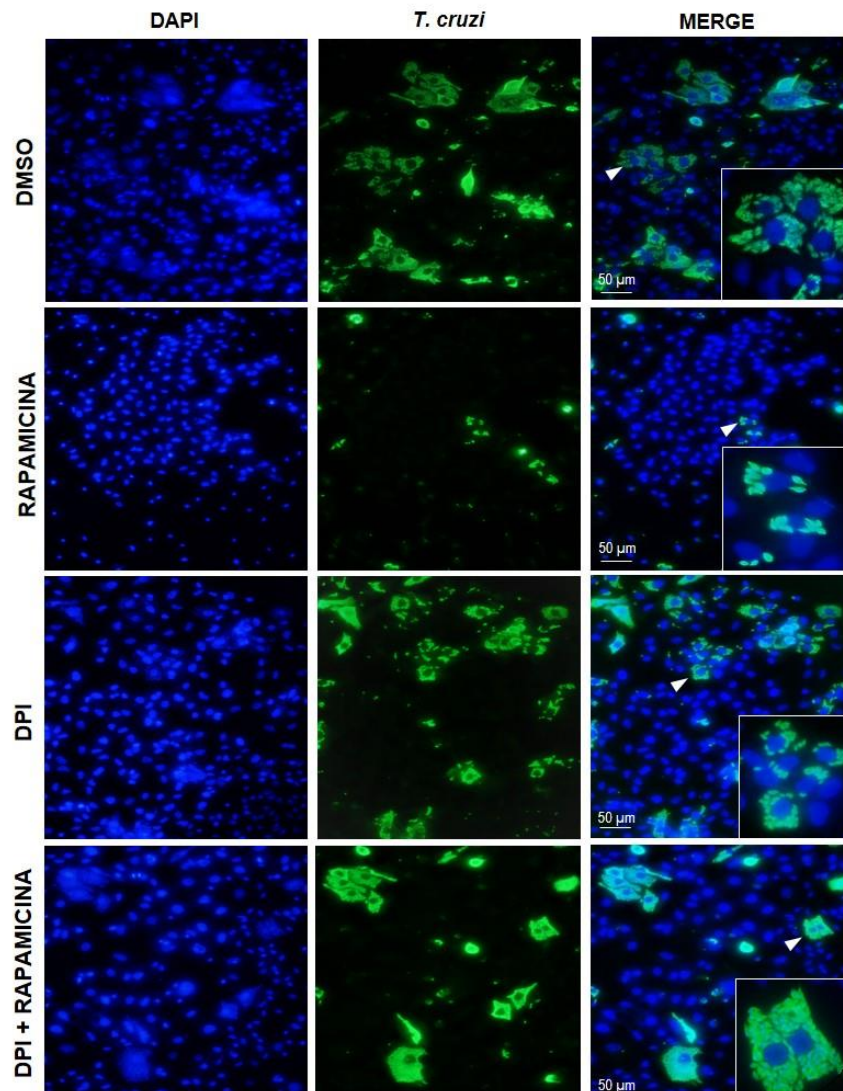
B

Figura 27 | Carga parasitaria en macrófagos derivados de médula ósea durante la inhibición de mTOR y de mtROS. Macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) obtenidos de ratones C57BL/6, fueron pretratados con DMSO (control) o con DPI (20 μ M) durante 3 h, o con rapamicina (100 nM) durante 90 min, o con DPI + rapamicina durante 3 h y 90 min, respectivamente. A continuación todas las condiciones fueron lavadas e infectadas con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos) durante 24 h. Además se utilizaron macrófagos sin pretratamiento, estimulados con IL-4 (80 nM) e infectados con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos), o estimulados con LPS (1 μ g/mL) +IFN γ (100 ng/mL) e infectados con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos) durante 24 h como controles positivos. Luego, todos los parásitos no internalizados fueron lavados, y todos los macrófagos cultivados en RPMI 10% SBF. Después de un total de 72 h fueron preparados para inmunofluorescencia indirecta. **(A)** Las barras muestran la replicación intracelular del *T. cruzi*, expresada como número de parásitos/100 células y representan la media \pm DE correspondiente de 3 experimentos independientes (* $p < 0.05$ respecto a rapamicina). **(B)** Micrografías representativas de MDMO pretratados con DMSO (control), rapamicina, DPI y DPI + rapamicina, donde se observan los núcleos celulares teñidos con DAPI, y las formas intracelulares del parásito, incubados con suero de pacientes con enfermedad de Chagas y un anticuerpo secundario anti IgGh conjugado con FITC. Los cuadros muestran un área de la micrografía (flechas) a mayor magnificación, e indican macrófagos infectados.

En conclusión, los resultados mostrados en esta tesis nos señalan que durante la inhibición de mTOR se produce el ensamblaje y activación del inflamasoma, acompañado por el aumento de la producción de superóxido mitocondrial, probablemente como mediador intracelular para la señalización de este programa inflamatorio. Además, la producción de este radical libre podría tener un efecto microbicida sobre *T. cruzi*, ya que la inhibición de su producción revierte parcialmente el efecto provocado por la inhibición de la vía de mTOR favoreciendo la replicación del parásito (Figura 29).

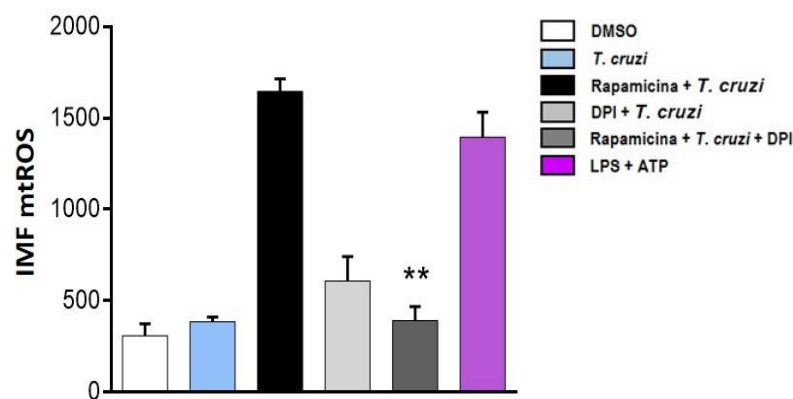


Figura 28 | Producción de mtROS en MDMO pretratados con rapamicina y DPI, e infectados con *T. cruzi*. Macrófagos derivados de medula ósea (MDMO) obtenidos de ratones C57BL/6 fueron pretratados con DMSO (control) o con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos) o con rapamicina (100 nM; 90 min) y luego infectados con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos), o con DPI (20 µM; 3 h) y luego infectados con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos), o pretratados con DPI (20 µM; 3 h) + rapamicina (100 nM; 90 min) y luego infectados con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos). A continuación todas las condiciones fueron lavadas y cultivadas durante 6 h. Además se utilizaron macrófagos sin pretratamiento y sin infección, estimulados con LPS (1 µg/mL) + ATP (5 mM) durante 6 h, como controles positivos. Posteriormente los MDMO fueron marcados con anti F4/80 (FITC) y CD11b (APC), y luego de ser lavados, fueron incubados con la sonda 5 µM MitoSOX (PE, Red) durante 15 min a 37 °C para la determinación de las mtROS. Los resultados son expresados como intensidad media de fluorescencia (IMF) utilizando el software FlowJo. Las barras representan la media ± DE correspondiente de 3 experimentos independientes (** p < 0.005 respecto al Rapamicina+*T. cruzi*).

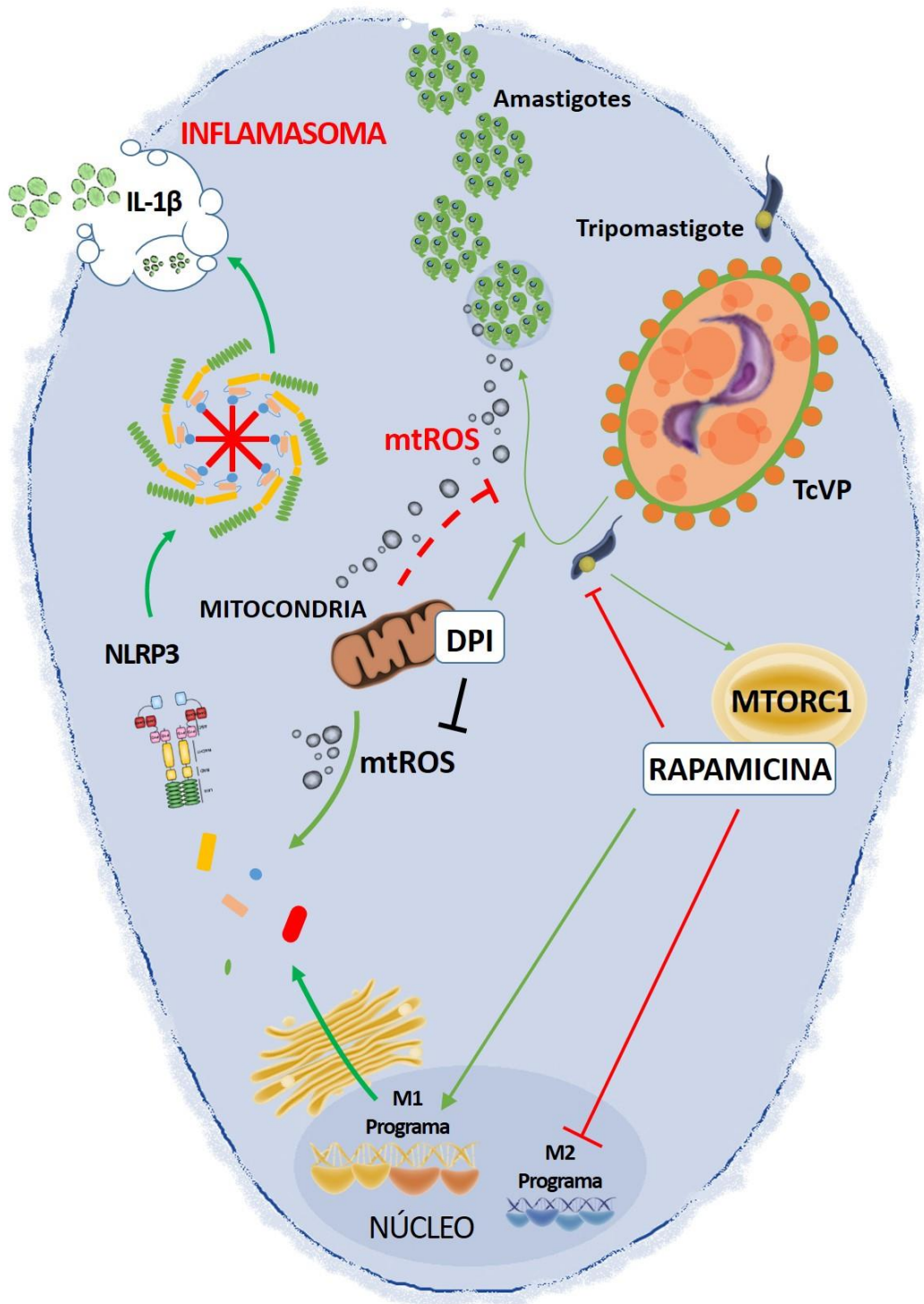


Figura 29 | Modelo de activación del inflammasoma y producción de mtROS inducidos por la inhibición de la vía mTOR en el macrófago y su efecto microbicida sobre el *T. cruzi*.

6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos hasta acá muestran que el control de la infección por el *T. cruzi*, depende inicialmente de la activación de los macrófagos a través de la producción de citoquinas inflamatorias, y cuya función es la de activar la producción de moléculas microbicidas contra el parásito. Por otro lado, es bien sabido que aunque la polarización M1 de los macrófagos promueve gran parte de la eliminación de los parásitos, eventualmente la activación de macrófagos M2 es la estrategia del sistema inmune para prevenir el estrés oxidativo sobre el tejido (49, 60, 61). La evasión del fenotipo M1 y la modulación hacia un fenotipo M2, es la principal estrategia que tiene el *T. cruzi* para obtener las biomoléculas necesarias para la progresión de su ciclo de reproducción.

Se ha reportado que la coordinación metabólica que acompaña al *switch* que hace el macrófago entre uno u otro fenotipo, ocurre con la participación de una importante vía de señalización conocida por el nombre de su quinasa mTOR. Esta proteína cumple una función crítica como regulador del metabolismo de la mayoría de células en general, y del macrófago en particular, por lo que es una molécula blanco de patógenos como el *T. cruzi* para llevar a cabo su invasión. En el presente estudio reportamos el rol de esta vía de señalización durante la polarización del macrófago inducida por el parásito y demostramos que esta activada en macrófagos derivados de médula ósea infectados *in vitro*. Además, pudimos observar que macrófagos peritoneales obtenidos de ratones infectados, fueron capaces de aumentar significativamente la activación de la vía mTOR, induciendo un aumento de la expresión de p-4EBP1 y p-P70S6K, al día 15 p.i., respecto a los macrófagos control provenientes de animales sin infección.

Dado que la vía de mTOR es una importante vía de señalización inducida por el parásito, se pudo observar que su inhibición farmacológica activó en un sentido inflamatorio a los macrófagos, reduciendo la producción de IL-10 y expresión de la enzima Arginasa I. En efecto, el

pretratamiento de macrófagos con rapamicina y su posterior infección con *T. cruzi*, reveló la activación del inflammasoma NLRP3 al tiempo que aumento la producción de IL-12, IL-6, TNF, IL-1 β y ROS mitocondrial. De esta forma, estos macrófagos pudieron limitar la replicación del parásito, cuando fueron pretratados con los inhibidores de mTOR (rapamycin, PP242 and LY249002).

Como se ha reportado, los mecanismos de invasión del *T. cruzi* utilizan los mismos sistemas de membranas dependientes de autofagia que activa el macrófago como mecanismo inmunológico para controlar la infección. En este contexto, otros estudios han demostrado que la inducción de la autofagia favorece la invasión y la replicación de este parásito cuando se lleva a cabo la inhibición farmacológica de la vía mTOR con rapamicina, y otros inhibidores (36, 110-112, 115). Sin embargo, estos mismos trabajos, utilizan modelos celulares diferentes, concentraciones de rapamicina 10 a 100 veces mayores, y tiempos de pretratamiento superiores como 4, 12 y 24 h. Aunque en nuestro modelo experimental las concentraciones e intervalos de tiempo empleados para inhibir la vía de mTOR podrían haber estado induciendo autofagia [rapamicina 100 nM, 90 min], se demostró que estas condiciones no sólo les permitieron a los macrófagos controlar la replicación del parásito (3 y 6 h p.i.), sino que dicho control microbicida ocurría a través de mecanismos independientes a esta ruta, no habiéndose observado activación de la isoforma LC3-II.

Por otro lado, otros reportes demostraron que la delección selectiva de las señales de activación de mTORC1 en macrófagos, promueve la producción de citoquinas inflamatorias (116), mientras que la delección selectiva de las señales de activación de mTORC2 inhibe la expresión del fenotipo M2, independientemente de la expresión del fenotipo M1 (117).

En contraste, la función del eje TSC1/2–mTOR activado a través de receptores TLR, respecto a la producción de citoquinas proinflamatorias permanece desconocida. En este sentido, estudios en MEF deficientes para el complejo TSC2, responden con una escasa producción de citoquinas inflamatorias debido a una deficiencia en la activación del factor IKK, así como también en la translocación del factor NF- κ B al núcleo (117). Sin embargo, otros estudios al respecto han reportado que el tratamiento con el inhibidor de mTOR rapamicina, potencia la producción de IL-12 a través de la activación de NF- κ B en células dendríticas mieloides, pero el mismo tratamiento inhibe la producción de esta citoquina en células dendríticas derivadas de monocitos y células dendríticas derivadas de médula ósea (118, 119). Además, macrófagos deficientes para el complejo TSC1 responden al estímulo con LPS con una producción de citoquinas como TNF α , IL-12 e IL-6 (89, 94, 100). Aunque la razón de esta inconsistencia entre estos estudios se desconoce, probablemente se deba a que son tipos de células diferentes y a los periodos de duración del tratamiento con el inhibidor rapamicina. En el presente estudio, nosotros demostramos que el pretratamiento durante 90 min con rapamicina en BMDM infectados con *T. cruzi*, indujo no sólo una remarcable producción de la citoquina IL-12, sino también en las citoquinas IL-6 y TNF α . En contraste, promovió una pronunciada disminución en la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10. En conjunto estos resultados indican que la inhibición de la vía de mTOR altera el balance de citoquinas en el macrófago hacia un fenotipo inflamatorio contra el parásito.

Por otro lado la participación de la vía de mTOR en la regulación de la expresión de IL-1 β fue estudiada en macrófagos murinos y humanos y en diferentes líneas celulares (120, 121), donde se reportó que aquellas líneas celulares deficientes para TSC1 estimuladas con de LPS, redujeron la síntesis tanto de la proteína como del mRNA de esta citoquina, mientras que los macrófagos deficientes para TSC1 con un tratamiento prolongado con rapamicina, rescataron

significativamente el fenotipo inflamatorio (89). En este sentido, en el presente estudio encontramos que el pretratamiento durante 90 min con rapamicina en MDMO infectados con *T. cruzi* condujo a una producción significativa de IL-1 β . Aunque se debe tener presente que las diferencias en los tiempos del tratamiento con rapamicina puede ser un determinante importante de los resultados obtenidos.

Respecto a los estudios llevados a cabo en modelos celulares Akt1 KO, se observó que la ausencia de esta molécula incrementó significativamente la expresión de la iNOS y producción de IL-12, potenciándose el efecto bactericida (122-124). En nuestros estudios encontramos que el pretratamiento con diferentes inhibidores de la vía de mTOR (rapamicina, PP242) y de PI3K (LY294002), indujo en el macrófago (MDMO y MP) un perfil inflamatorio, aunque sin expresión de iNOS, similar al M1, permitiéndoles reducir significativamente la carga parasitaria (número de parásitos/100 células totales), respecto a los controles sin pretratamiento. En contraste, y respecto al perfil alternativo de macrófago M2, su activación es promovida principalmente a través de la señalización del receptor para la IL-4 y de la activación del factor de transcripción STAT6. En este sentido, los estudios en macrófagos deficientes para TSC1, indicaron que estos macrófagos fueron incapaces de activarse alternativamente en respuesta a la IL-4, remarcando que la señalización de mTOR es un regulador negativo del perfil alternativo (122, 125). Sin embargo este fenómeno no implicó efectos sobre la fosforilación de STAT6, sino más bien efectos sobre la inhibición en la retroalimentación de Akt y el substrato 2 del receptor de insulina (IRS2), que también está comprometido en la señalización del IL-4R (89, 125). Además, en aquellos macrófagos deficientes para TSC1, los efectos de la rapamicina en bajas dosis (que inhiben preferencialmente a mTORC1) promovieron una activación alternativa del macrófago en respuesta a IL-4. Sin embargo, trabajos recientes en los que se utilizaron concentraciones más altas de rapamicina y torin, además de

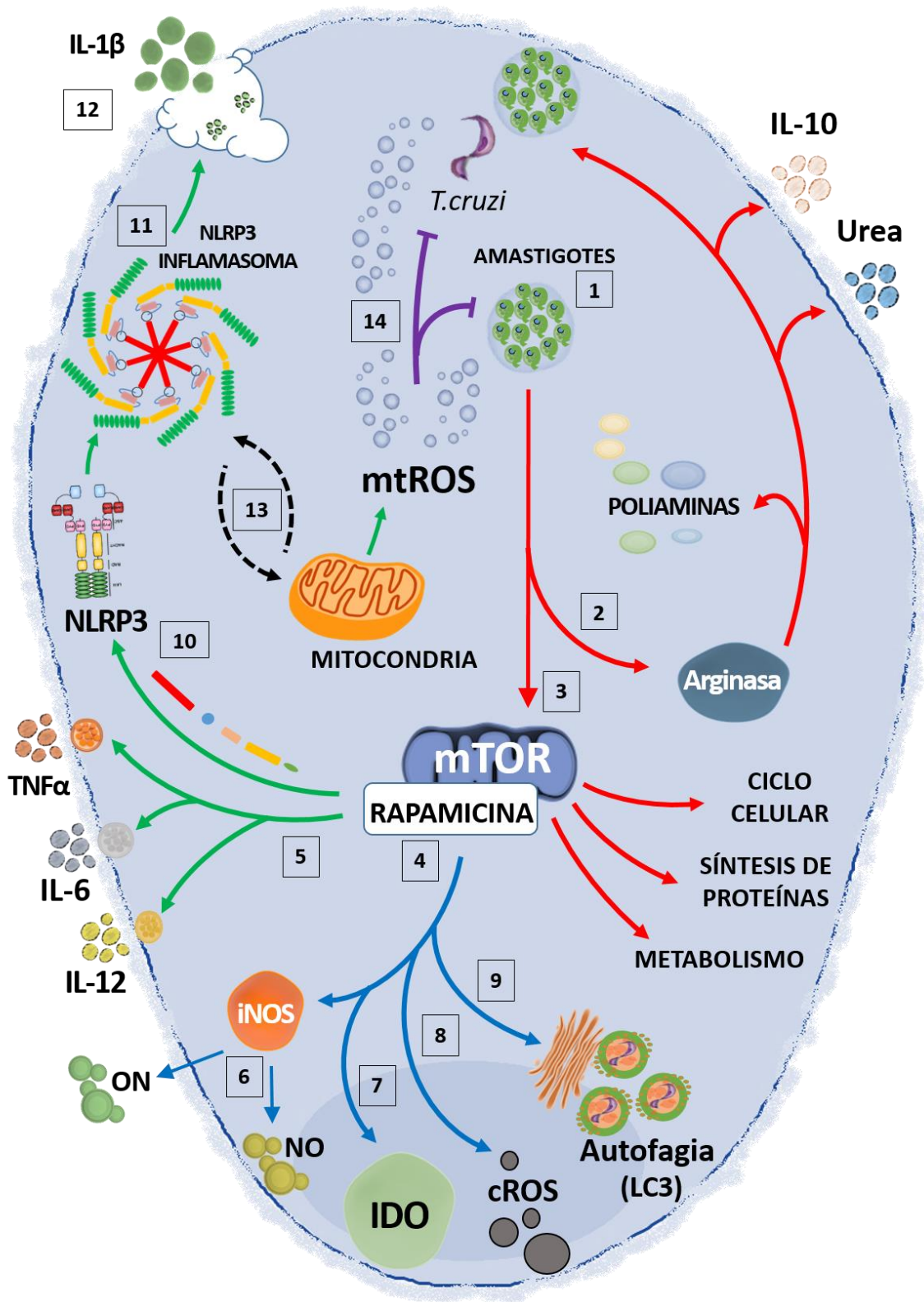
macrófagos deficientes para rictor, revelaron que mTORC2 es un regulador crítico para la activación del fenotipo alternativo (117, 126). Es decir que mTORC2 estaría actuando en paralelo junto al factor STAT6 para inducir la activación alternativa del macrófago, además de la cooperación de otros eventos que confluyen en la expresión de IRF4 (126). En el presente estudio, los efectos de la rapamicina promovieron un descenso significativo en la expresión y actividad de la enzima Arginasa I y en la producción de IL-10 en MDMO infectados con *T. cruzi*, acompañados también como se mencionó previamente, por un descenso en la expresión de la enzima iNOS. Además, aunque la rapamicina no indujo la producción de cROS, si promovió la producción de IL-1 β y mtROS acompañada por la de citoquinas inflamatorias como IL-12, IL-6 y TNF α .

Por otro lado, estudios en animales deficientes para el receptor NOD1 en los que la parasitemia y mortalidad fue significativamente mayor respecto a los WT pusieron de manifiesto por primera vez la participación de un NLR en la respuesta contra el *T. cruzi* (73). Además, dichos animales seguían siendo capaces de producir citoquinas a un nivel sistémico, por lo que sugirió la participación de otros NLR en la respuesta contra el parásito. El receptor NLRP3 por ejemplo, es activado por el daño lisosomal provocado por el escape del parásito de la vacuola parasitófora, independientemente a la producción de ROS (72). Estos estudios mostraron además que la producción de NO es abolida en macrófagos primarios, provenientes de ratones infectados con *T. cruzi* (cepa Y) deficientes para NLRP3. Sin embargo, aunque algunos autores (61), argumentan que dicho fenómeno es dependiente tanto de la IL-1 β y del IL-1R, otros autores postulan que la activación del NLRP3 depende de estas moléculas (114). A pesar de las mencionadas sugerencias de los autores, estos estudios enfatizan la complejidad de la respuesta antiparasitaria orquestada por el inflamasoma NLRP3 junto a otros receptores innatos, reflejando la diversidad de mecanismos microbicidas ensamblados contra el *T. cruzi* (127, 128). En nuestros estudios, el

efecto de la rapamicina sobre MDMO infectados con el parásito, indujo la activación del receptor NLRP3, producción de IL-1 β y mtROS (como segundo mensajero de acuerdo a (127, 129, 130) mientras que promovió una disminución en la de ON, al tiempo que no modificó la producción de cROS.

Varios estudios han implicado a cROS como un segundo mensajero esencial para la activación del inflamasoma Caspasa1/ASC (131, 132). En dichas investigaciones, aunque se demostró una retroalimentación entre la señalización de IL-1 β y la producción de cROS en macrófagos infectados con *T. cruzi*, los mecanismos moleculares involucrados en la dinámica de estas dos moléculas permanece desconocido (114). Investigaciones previas en este sentido, encontraron que la IL-1 β es capaz de estimular a la fosfolipasa A2 promoviendo la liberación de ácido araquidónico. Dado que el ácido araquidónico puede activar la NADPH oxidasa para producir superóxido, es posible que este ácido graso pueda servir como un intermedio en la activación de enzimas inducidas por IL-1 β , conduciendo así a la producción de ROS (132, 133). En nuestros experimentos se demostró que el efecto de la rapamicina en macrófagos infectados con *T. cruzi*, indujo una producción significativa de mtROS. Esto estaría sugiriendo que dicho mecanismo está participando en el control de la replicación de *T. cruzi*, teniendo en cuenta que el inhibidor de la NADPH oxidasa (DPI) invierte parcialmente el efecto de la rapamicina. En este sentido, la importancia de mtROS sobre el control del crecimiento intracelular de microorganismos ya se ha demostrado en macrófagos tratados con metformina e infectados con *M. tuberculosis*. En efecto, la metformina es un activador de la quinasa activada por AMP (AMPK), que desempeña un papel fundamental en el metabolismo y la homeostasis energética. Nuestros resultados en este sentido indican que la modulación del metabolismo en los macrófagos puede ser una nueva herramienta terapéutica en el control de las infecciones intracelulares (134).

En resumen, la relevancia de esta investigación radica en el conocimiento logrado acerca del efecto de la inhibición de la vía mTOR macrófagos infectados con *T. cruzi*, el cual le permite controlar el crecimiento intracelular del parásito a través de la activación del inflammasoma NLRP3 y la producción de mtROS, remarcando que las enzimas iNOS e IDO no estuvieron involucradas. Así, la activación del inflammasoma y la inducción de ROS mitocondrial pueden ser relevantes en el control de la replicación de *T. cruzi* como así también de las infecciones de patógenos que residen en los macrófagos (Figura 30).



- Circuitos bloqueados
- Circuitos no involucrados
- Circuitos activados

Figura 30 | Modelo integrador de los eventos intracelulares provocados por la inhibición de la vía mTOR en el macrófago, y su repercusión en la sobrevida del *T. cruzi*. Una vez que los tripomastigotes han logrado alcanzar el citoplasma del macrófago y escapar de los mecanismos microbicidas de la vacuola parasitófora, comienzan su transformación hacia la forma amastigote (1). El *T. cruzi* no solo es capaz de polarizar al macrófago en un sentido alternativo (2), promoviendo la producción de IL-10, expresión de arginasa y producción de poliaminas, sino que además, induce la actividad de la vía mTOR (3) induciendo la síntesis de proteínas y la activación del metabolismo en general para asegurar su replicación. En este contexto, ambas rutas de señalización son objeto clave para la infección favoreciendo el crecimiento, replicación y diseminación del parásito [Flechas rojas]. Sin embargo, durante la inhibición de mTOR (en nuestro modelo) con rapamicina (4), todos los circuitos previamente mencionados fueron inhibidos, con la consecuente disminución en la producción de Urea e IL-10. En este sentido la replicación del parásito disminuyó significativamente por dos eventos importantes: bloqueo de circuitos alternativos y activación de circuitos inflamatorios. En los macrófagos cuya vía de mTOR se encuentra inhibida se promueve la producción de marcadores inflamatorios como IL-12, IL-6 y TNF α (5). Sorprendentemente, estas células demostraron tener inhibida la expresión de iNOS y por ende, la producción de ON (6). Además, la inhibición de mTOR no involucró la activación de circuitos como el de la enzima IDO (7), cROS (8) ni el de la autofagia (9). Finalmente, los resultados de este trabajo doctoral demostraron que la infección del *T. cruzi* junto con la inhibición de la vía mTOR inducen la activación de la vía del Inflamasoma (10), con la participación del receptor NLRP3 (11) y la consecuente producción de IL-1 β (12). Además, concomitantemente a la activación de este complejo multienzimático, aumentó la producción de mtROS como segundo mensajero (13) promoviendo una retroalimentación positiva entre ambos. Como se sugiere en este trabajo, dicho aumento de las mtROS podría actuar como mediador microbicida (14) causante de la disminución en la carga parasitaria durante la inhibición de mTOR (15).

CONCLUSIONES

1. El parásito del *T. cruzi* es capaz de inducir la activación de la vía de mTOR, lo cual podría favorecer su sobrevivencia en macrófagos murinos.
2. La inhibición de la vía de mTOR en macrófagos infectados con *T. cruzi* reduce la expresión y actividad de las enzimas Arginasa e iNOS, la producción de IL-10, mientras que induce la producción de IL-12, IL-6 y TNF- α .
3. La inhibición de la vía de mTOR en macrófagos infectados con *T. cruzi* redujo significativamente la carga parasitaria, sugiriendo que la activación alternativa y la vía de mTOR son fundamentales para la sobrevivencia y replicación intracelular del parásito.
4. La inhibición de mTOR reduce significativamente la carga parasitaria en el macrófago de forma independiente a la producción de Óxido Nítrico, de la actividad de IDO, de la producción de cROS, y de los receptores TLR-2, TLR-4 e IFN-IR.
5. La reducción en la carga parasitaria causada por la inhibición de mTOR en el macrófago podría involucrar la participación de los circuitos TNF α e IL-6 que mantendrían un estado inflamatorio.
6. Adicionalmente, la inhibición de mTOR en macrófagos infectados indujo la expresión del receptor NLRP3 y un aumento en la producción de IL-1 β .

7. Macrófagos KO para NLRP3 fueron capaces de revertir el efecto de rapamicina sobre la carga parasitaria sugiriendo que la activación del inflamasoma podría ser un mecanismo inflamatorio alternativo involucrado en la eliminación del *T. cruzi* cuando mTOR se encuentra inhibido.

8. La inhibición de la vía de mTOR junto con la activación del inflamasoma NLRP3 promovieron un aumento en la producción de mtROS, comprobado a través del inhibidor de NADPH oxidasa (DPI), sugiriendo que la producción de este tipo de moléculas podría ser el mecanismo efector que está matando al parásito durante la inhibición de mTOR.

ANEXO

Trabajos publicados durante el desarrollo de la presente tesis doctoral

Rojas Márquez JD, Ana Y, Baigorri RE, Stempin CC, Cerban FM (2018) mTOR inhibition in *Trypanosoma cruzi* infected macrophages leads to an intracellular profile that is detrimental for infection. *Front Immunol.* 9:313. doi: 10.3389/fimmu.2018.00313.

Stempin CC, **Rojas Márquez JD**, Ana, Y and Cerban, FM (2017) GRAIL and otubain-1 are related to T cell hyporesponsiveness during *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 11(1):e0005307. doi: 10.1371/journal.pntd.0005307.

Distinciones

Rojas Márquez JD (2016) “Mediadores intracelulares involucrados en la polarización del macrófago durante la infección con *Trypanosoma cruzi*. Implicancias en la sobrevivencia del parásito” Concurso “Mi tesis en 3 minutos” (primer puesto) en el marco de las Jornadas de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organization WH. Chagas Disease (2017). Available from: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
2. Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* (2010) 375(9723):1388-402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
3. Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta tropica* (2010) 115(1-2):22-7. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.07.019.
4. Jackson Y, Pinto A, Pett S. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. *Tropical medicine & international health : TM & IH* (2014) 19(2):212-8. doi: 10.1111/tmi.12235.
5. Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* (2009) 104 Suppl 1:17-30.
6. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* (2007) 102 Suppl 1:75-85.
7. Cucunuba ZM, Okuwoga O, Basanez MG, Nouvellet P. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & vectors* (2016) 9:42. doi: 10.1186/s13071-016-1315-x.
8. Martins-Melo FR, Ramos AN, Jr., Alencar CH, Lange W, Heukelbach J. Mortality of Chagas' disease in Brazil: spatial patterns and definition of high-risk areas. *Tropical medicine & international health : TM & IH* (2012) 17(9):1066-75. doi: 10.1111/j.1365-3156.2012.03043.x.
9. Ventura-Garcia L, Roura M, Pell C, Posada E, Gascon J, Aldasoro E, et al. Socio-cultural aspects of Chagas disease: a systematic review of qualitative research. *PLoS neglected tropical diseases* (2013) 7(9):e2410. doi: 10.1371/journal.pntd.0002410.
10. Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *Bmj* (2003) 326(7404):1444-8. doi: 10.1136/bmj.326.7404.1444.
11. Kirchhoff LV, Weiss LM, Wittner M, Tanowitz HB. Parasitic diseases of the heart. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* (2004) 9:706-23. PubMed PMID: 14766402.
12. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* (2012) 54(6):845-52. doi: 10.1093/cid/cir956.

13. Rodrigues JC, Godinho JL, de Souza W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Sub-cellular biochemistry* (2014) 74:1-42. doi: 10.1007/978-94-007-7305-9_1.
14. Teixeira AR, Gomes C, Nitz N, Sousa AO, Alves RM, Guimaro MC, et al. Trypanosoma cruzi in the chicken model: Chagas-like heart disease in the absence of parasitism. *PLoS neglected tropical diseases* (2011) 5(3):e1000. doi: 10.1371/journal.pntd.0001000.
15. Pellegrini A, Guinazu N, Giordanengo L, Cano RC, Gea S. The role of Toll-like receptors and adaptive immunity in the development of protective or pathological immune response triggered by the Trypanosoma cruzi protozoan. *Future microbiology* (2011) 6(12):1521-33. doi: 10.2217/fmb.11.122.
16. Une C, Andersson J, Orn A. Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with Trypanosoma cruzi. *Clinical and experimental immunology* (2003) 134(2):195-201. PubMed PMID: 14616777.
17. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in immunology* (2014) 5:514. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514.
18. Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas' disease. *Clinical microbiology reviews* (1992) 5(4):400-19. PubMed PMID: 1423218.
19. Barrias ES, de Carvalho TM, De Souza W. Trypanosoma cruzi: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Frontiers in immunology* (2013) 4:186. doi: 10.3389/fimmu.2013.00186.
20. Seljelid R, Eskeland T. The biology of macrophages: I. General principles and properties. *European journal of haematology* (1993) 51(5):267-75. PubMed PMID: 8282087.
21. Seljelid R, Busund LT. The biology of macrophages: II. Inflammation and tumors. *European journal of haematology* (1994) 52(1):1-12. PubMed PMID: 8299765.
22. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews Immunology* (2005) 5(12):953-64. doi: 10.1038/nri1733.
23. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of pathology* (2013) 229(2):176-85. doi: 10.1002/path.4133.
24. Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in immunopathology* (2013) 35(5):585-600. doi: 10.1007/s00281-013-0367-7.
25. Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of Trypanosoma cruzi infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infection and immunity* (1996) 64(1):128-34. PubMed PMID: 8557330.

26. Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection and immunity* (1996) 64(6):1961-7. PubMed PMID.
27. Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunology letters* (1992) 33(1):35-40. PubMed PMID: 1330900.
28. Silva MT, Correia-Neves M. Neutrophils and macrophages: the main partners of phagocyte cell systems. *Frontiers in immunology* (2012) 3:174. doi: 10.3389/fimmu.2012.00174. PubMed PMID: 22783254.
29. Venturini G, Colasanti M, Salvati L, Gradoni L, Ascenzi P. Nitric oxide inhibits falcipain, the *Plasmodium falciparum* trophozoite cysteine protease. *Biochemical and biophysical research communications* (2000) 267(1):190-3. doi: 10.1006/bbrc.1999.1922.
30. Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infection and immunity* (1994) 62(11):5177-82. PubMed PMID: 7523307.
31. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews Immunology* (2003) 3(1):23-35. doi: 10.1038/nri978.
32. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation* (2012) 122(3):787-95. doi: 10.1172/JCI59643.
33. Novak ML, Koh TJ. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. *The American journal of pathology* (2013) 183(5):1352-63. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.06.034.
34. Caler EV, Morty RE, Burleigh BA, Andrews NW. Dual role of signaling pathways leading to Ca(2+) and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity* (2000) 68(12):6602-10. PubMed PMID: 11083771.
35. Rodriguez M, Terrazas LI, Marquez R, Bojalil R. Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection. *Parasite immunology* (1999) 21(4):177-85. PubMed PMID: 10320615.
36. Romano PS, Arboit MA, Vazquez CL, Colombo MI. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. *Autophagy* (2009) 5(1):6-18. PubMed PMID: 19115481.
37. Tardieux I, Nathanson MH, Andrews NW. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. *The Journal of experimental medicine* (1994) 179(3):1017-22. PubMed PMID: 8113670.
38. Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *Journal of cell science* (2003) 116(Pt 17):3611-22. doi: 10.1242/jcs.00666.

39. Fernandes MC, Andrews NW. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS microbiology reviews* (2012) 36(3):734-47. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x.
40. Maeda FY, Cortez C, Yoshida N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Frontiers in immunology* (2012) 3:361. doi: 10.3389/fimmu.2012.00361. PubMed PMID: 23230440; PubMed Central PMCID: PMC3515895.
41. Coelho PS, Klein A, Talvani A, Coutinho SF, Takeuchi O, Akira S, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. *Journal of leukocyte biology* (2002) 71(5):837-44. PubMed PMID: 11994509.
42. Schmitz V, Svensjo E, Serra RR, Teixeira MM, Scharfstein J. Proteolytic generation of kinins in tissues infected by *Trypanosoma cruzi* depends on CXC chemokine secretion by macrophages activated via Toll-like 2 receptors. *Journal of leukocyte biology* (2009) 85(6):1005-14. doi: 10.1189/jlb.1108693. PubMed PMID: 19293401.
43. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Current protocols in immunology* (2008) Chapter 14:Unit 14 1. doi: 10.1002/0471142735.im1401s83. PubMed PMID: 19016445; PubMed Central PMCID: PMC2834554.
44. Yoshida N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* (2006) 78(1):87-111. doi: /S0001-37652006000100010. PubMed PMID: 16532210.
45. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* (2005) 309(5733):409-15. doi: 10.1126/science.1112631. PubMed PMID: 16020725.
46. Alves MJ, Colli W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB life* (2007) 59(4-5):274-9. doi: 10.1080/15216540701200084. PubMed PMID: 17505965.
47. Murta AC, Persechini PM, Padron Tde S, de Souza W, Guimaraes JA, Scharfstein J. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Molecular and biochemical parasitology* (1990) 43(1):27-38. PubMed PMID: 1705310.
48. Paiva CN, Souto-Padron T, Costa DA, Gattass CR. High expression of a functional cruzipain by a non-infective and non-pathogenic *Trypanosoma cruzi* clone. *Parasitology* (1998) 117 (Pt 5):483-90. PubMed PMID: 9836313.
49. Stempin CC, Garrido VV, Dulgerian LR, Cerban FM. Cruzipain and SP600125 induce p38 activation, alter NO/arginase balance and favor the survival of *Trypanosoma cruzi* in macrophages. *Acta tropica* (2008) 106(2):119-27. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.02.004. PubMed PMID: 18359001.
50. Schenkman S, Jiang MS, Hart GW, Nussenzweig V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell* (1991) 65(7):1117-25. PubMed PMID: 1712251.

51. Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE, et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* (1992) 71(7):1117-30. PubMed PMID: 1473148.
52. Rodriguez A, Samoff E, Rioult MG, Chung A, Andrews NW. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *The Journal of cell biology* (1996) 134(2):349-62. PubMed PMID: 8707821; PubMed Central PMCID: PMC2120885.
53. Vieira M, Dutra JM, Carvalho TM, Cunha-e-Silva NL, Souto-Padron T, Souza W. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Histochemistry and cell biology* (2002) 118(6):491-500. doi: 10.1007/s00418-002-0477-0. PubMed PMID: 12483314.
54. Chuenkova MV, Pereira MA. The *T. cruzi* trans-sialidase induces PC12 cell differentiation via MAPK/ERK pathway. *Neuroreport* (2001) 12(17):3715-8. PubMed PMID: 11726780.
55. de Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International journal of cell biology* (2010) 2010. doi: 10.1155/2010/295394. PubMed PMID: 20811486; PubMed Central PMCID: PMC2926652.
56. Steevels TA, Meyaard L. Immune inhibitory receptors: essential regulators of phagocyte function. *Eur J Immunol* (2011) 41(3):575-87. doi: 10.1002/eji.201041179. PubMed PMID: 21312193.
57. Albina JE, Reichner JS. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer metastasis reviews* (1998) 17(1):39-53. PubMed PMID: 9544422.
58. Gutierrez FR, Mineo TW, Pavanelli WR, Guedes PM, Silva JS. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* (2009) 104 Suppl 1:236-45. PubMed PMID: 19753479.
59. Kuhn RE. Macrophages in experimental Chagas' disease. *Immunology series* (1994) 60:495-502. PubMed PMID: 8251589.
60. Stempin C, Giordanengo L, Gea S, Cerban F. Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *Journal of leukocyte biology* (2002) 72(4):727-34. PubMed PMID: 12377942.
61. Stempin CC, Dulgerian LR, Garrido VV, Cerban FM. Arginase in parasitic infections: macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals. *Journal of biomedicine & biotechnology* (2010) 2010:683485. doi: 10.1155/2010/683485. PubMed PMID: 20029630; PubMed Central PMCID: PMC2792949.
62. Mosser DM, Zhang X. Activation of murine macrophages. *Current protocols in immunology* (2008) Chapter 14:Unit 14 2. doi: 10.1002/0471142735.im1402s83. PubMed PMID: 19016446; PubMed Central PMCID: PMC2822273.
63. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology* (2008) 8(12):958-69. doi: 10.1038/nri2448. PubMed PMID: 19029990; PubMed Central PMCID: PMC2724991.

64. Mills CD. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Frontiers in immunology* (2015) 6:212. doi: 10.3389/fimmu.2015.00212. PubMed PMID: 25999950; PubMed Central PMCID: PMC4419847.
65. Zhang S, Kim CC, Batra S, McKerrow JH, Loke P. Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines. *PLoS neglected tropical diseases* (2010) 4(3):e648. doi: 10.1371/journal.pntd.0000648. PubMed PMID: 20361029; PubMed Central PMCID: PMC2846935.
66. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* (2005) 23(4):344-6. doi: 10.1016/j.immuni.2005.10.001. PubMed PMID: 16226499.
67. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* (2014) 41(1):14-20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008. PubMed PMID: 25035950; PubMed Central PMCID: PMC4123412.
68. Stempin CC, Cerban, F.M. Macrófagos e inducción de arginasa como mecanismo de evasión de parásitos. *Medicina* (2007) 67(6):2.
69. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology* (2009) 27:451-83. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132532. PubMed PMID: 19105661.
70. Pfefferkorn ER. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1984) 81(3):908-12. PubMed PMID: 6422465; PubMed Central PMCID: PMC344948.
71. Knobel CP, Martinez FF, Fretes RE, Diaz Lujan C, Theumer MG, Cervi L, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* (2010) 24(8):2689-701. doi: 10.1096/fj.09-150920. PubMed PMID: 20233946.
72. Dey N, Sinha M, Gupta S, Gonzalez MN, Fang R, Endsley JJ, et al. Caspase-1/ASC inflammasome-mediated activation of IL-1beta-ROS-NF-kappaB pathway for control of *Trypanosoma cruzi* replication and survival is dispensable in NLRP3-/- macrophages. *PloS one* (2014) 9(11):e111539. doi: 10.1371/journal.pone.0111539. PubMed PMID: 25372293; PubMed Central PMCID: PMC4221042.
73. Silva GK, Gutierrez FR, Guedes PM, Horta CV, Cunha LD, Mineo TW, et al. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of immunology* (2010) 184(3):1148-52. doi: 10.4049/jimmunol.0902254. PubMed PMID: 20042586.
74. Byrne GI, Lehmann LK, Kirschbaum JG, Borden EC, Lee CM, Brown RR. Induction of tryptophan degradation in vitro and in vivo: a gamma-interferon-stimulated activity. *Journal of interferon research* (1986) 6(4):389-96. PubMed PMID: 3095441.

75. Accarias S, Lugo-Villarino G, Foucras G, Neyrolles O, Boullier S, Tabouret G. Pyroptosis of resident macrophages differentially orchestrates inflammatory responses to *Staphylococcus aureus* in resistant and susceptible mice. *Eur J Immunol* (2015) 45(3):794-806. doi: 10.1002/eji.201445098. PubMed PMID: 25472006.
76. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell* (2002) 10(2):417-26. PubMed PMID: 12191486.
77. Mossner J, Hammermann R, Racke K. Concomitant down-regulation of L-arginine transport and nitric oxide (NO) synthesis in rat alveolar macrophages by the polyamine spermine. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* (2001) 14(4):297-305. doi: 10.1006/pupt.2001.0297. PubMed PMID: 11440558.
78. El-Gayar S, Thuring-Nahler H, Pfeilschifter J, Rollinghoff M, Bogdan C. Translational control of inducible nitric oxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages. *Journal of immunology* (2003) 171(9):4561-8. PubMed PMID: 14568929.
79. Lee SJ, Bai SK, Lee KS, Namkoong S, Na HJ, Ha KS, et al. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. *Molecules and cells* (2003) 16(1):97-105. PubMed PMID: 14503852.
80. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *The Journal of nutrition* (2007) 137(6 Suppl 2):1616S-20S. PubMed PMID: 17513437.
81. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *The Biochemical journal* (1998) 336 (Pt 1):1-17. PubMed PMID: 9806879; PubMed Central PMCID: PMC1219836.
82. Stempin CC, Tanos TB, Coso OA, Cerban FM. Arginase induction promotes *Trypanosoma cruzi* intracellular replication in Cruzipain-treated J774 cells through the activation of multiple signaling pathways. *Eur J Immunol* (2004) 34(1):200-9. doi: 10.1002/eji.200324313. PubMed PMID: 14971046.
83. Giordanengo L, Guinazu N, Stempin C, Fretes R, Cerban F, Gea S. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. *Eur J Immunol* (2002) 32(4):1003-11. doi: 10.1002/1521-4141(200204)32:4<1003::AID-IMMU1003>3.0.CO;2-P. PubMed PMID: 11920566.
84. Dulgerian LR, Garrido VV, Stempin CC, Cerban FM. Programmed death ligand 2 regulates arginase induction and modifies *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages during murine experimental infection. *Immunology* (2011) 133(1):29-40. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03406.x. PubMed PMID: 21303364; PubMed Central PMCID: PMC3088965.
85. Garrido VV, Dulgerian LR, Stempin CC, Cerban FM. The increase in mannose receptor recycling favors arginase induction and *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages. *International journal of biological sciences* (2011) 7(9):1257-72. PubMed PMID: 22110379; PubMed Central PMCID: PMC3221363.

86. Schmitz F, Heit A, Dreher S, Eisenacher K, Mages J, Haas T, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells. *Eur J Immunol* (2008) 38(11):2981-92. doi: 10.1002/eji.200838761. PubMed PMID: 18924132.
87. Vergadi E, Ieronymaki E, Lyroni K, Vaporidi K, Tsatsanis C. Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. *Journal of immunology* (2017) 198(3):1006-14. doi: 10.4049/jimmunol.1601515. PubMed PMID: 28115590.
88. Zubova SG, Bykova TV. [REGULATION OF THE mTOR SIGNALING PATHWAY IN MACROPHAGES IN VARIOUS PATHOLOGIES]. *Tsitologiya* (2015) 57(11):755-60. PubMed PMID: 27012089.
89. Byles V, Covarrubias AJ, Ben-Sahra I, Lamming DW, Sabatini DM, Manning BD, et al. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nature communications* (2013) 4:2834. doi: 10.1038/ncomms3834. PubMed PMID: 24280772; PubMed Central PMCID: PMC3876736.
90. Linke M, Fritsch SD, Sukhbaatar N, Hengstschlager M, Weichhart T. mTORC1 and mTORC2 as regulators of cell metabolism in immunity. *FEBS letters* (2017) 591(19):3089-103. doi: 10.1002/1873-3468.12711. PubMed PMID: 28600802.
91. Katholnig K, Linke M, Pham H, Hengstschlager M, Weichhart T. Immune responses of macrophages and dendritic cells regulated by mTOR signalling. *Biochemical Society transactions* (2013) 41(4):927-33. doi: 10.1042/BST20130032. PubMed PMID: 23863158.
92. Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB, Horton MR. Regulation of immune responses by mTOR. *Annual review of immunology* (2012) 30:39-68. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075024. PubMed PMID: 22136167; PubMed Central PMCID: PMC3616892.
93. Perl A. Activation of mTOR (mechanistic target of rapamycin) in rheumatic diseases. *Nature reviews Rheumatology* (2016) 12(3):169-82. doi: 10.1038/nrrheum.2015.172. PubMed PMID: 26698023; PubMed Central PMCID: PMC5314913.
94. Pan H, O'Brien TF, Zhang P, Zhong XP. The role of tuberous sclerosis complex 1 in regulating innate immunity. *Journal of immunology* (2012) 188(8):3658-66. doi: 10.4049/jimmunol.1102187. PubMed PMID: 22412198; PubMed Central PMCID: PMC3324625.
95. Dibble CC, Elis W, Menon S, Qin W, Klekota J, Asara JM, et al. TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Molecular cell* (2012) 47(4):535-46. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.009. PubMed PMID: 22795129; PubMed Central PMCID: PMC3693578.
96. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* (2012) 149(2):274-93. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017. PubMed PMID: 22500797; PubMed Central PMCID: PMC3331679.
97. Turnquist HR, Cardinal J, Macedo C, Rosborough BR, Sumpter TL, Geller DA, et al. mTOR and GSK-3 shape the CD4+ T-cell stimulatory and differentiation capacity of myeloid DCs after exposure to LPS. *Blood* (2010) 115(23):4758-69. doi: 10.1182/blood-2009-10-251488. PubMed PMID: 20335217; PubMed Central PMCID: PMC2890188.

98. Ohtani M, Nagai S, Kondo S, Mizuno S, Nakamura K, Tanabe M, et al. Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. *Blood* (2008) 112(3):635-43. doi: 10.1182/blood-2008-02-137430. PubMed PMID: 18492954; PubMed Central PMCID: PMC2481549.
99. Ip WKE, Hoshi N, Shouval DS, Snapper S, Medzhitov R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science* (2017) 356(6337):513-9. doi: 10.1126/science.aal3535. PubMed PMID: 28473584.
100. Zhu L, Yang T, Li L, Sun L, Hou Y, Hu X, et al. TSC1 controls macrophage polarization to prevent inflammatory disease. *Nature communications* (2014) 5:4696. doi: 10.1038/ncomms5696. PubMed PMID: 25175012.
101. Weichhart T, Saemann MD. The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications. *Annals of the rheumatic diseases* (2008) 67 Suppl 3:iii70-4. doi: 10.1136/ard.2008.098459. PubMed PMID: 19022819.
102. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Sistemas Nacionales de Bioterios (2017). Available from: <http://www.bioterios.mincyt.gob.ar/>.
103. Stempin CC, Rojas Marquez JD, Ana Y, Cerban FM. GRAIL and Otubain-1 are Related to T Cell Hyporesponsiveness during *Trypanosoma cruzi* Infection. *PLoS neglected tropical diseases* (2017) 11(1):e0005307. doi: 10.1371/journal.pntd.0005307. PubMed PMID: 28114324; PubMed Central PMCID: PMC5289611.
104. Weischenfeldt J, Porse B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH protocols* (2008) 2008:pdb prot5080. doi: 10.1101/pdb.prot5080. PubMed PMID: 21356739.
105. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* (1976) 72:248-54. PubMed PMID: 942051.
106. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry* (1982) 126(1):131-8. PubMed PMID: 7181105.
107. Van Zeveren AM, Casaert S, Alvinerie M, Geldhof P, Claerebout E, Vercruyse J. Experimental selection for ivermectin resistance in *Ostertagia ostertagi* in cattle. *Veterinary parasitology* (2007) 150(1-2):104-10. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.09.004. PubMed PMID: 17949912.
108. Barquilla A, Crespo JL, Navarro M. Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2008) 105(38):14579-84. doi: 10.1073/pnas.0802668105. PubMed PMID: 18796613; PubMed Central PMCID: PMC2567229.
109. Stempin CC, Cerban FM. [Macrophages and arginase induction as a mechanism for parasite escape]. *Medicina* (2007) 67(6 Pt 2):737-46. PubMed PMID: 18422071.

110. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* (2016) 12(1):1-222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356. PubMed PMID: 26799652; PubMed Central PMCID: PMC4835977.
111. Romano PS, Cueto JA, Casassa AF, Vanrell MC, Gottlieb RA, Colombo MI. Molecular and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. *IUBMB life* (2012) 64(5):387-96. doi: 10.1002/iub.1019. PubMed PMID: 22454195; PubMed Central PMCID: PMC3709976.
112. Vanrell MC, Cueto JA, Barclay JJ, Carrillo C, Colombo MI, Gottlieb RA, et al. Polyamine depletion inhibits the autophagic response modulating *Trypanosoma cruzi* infectivity. *Autophagy* (2013) 9(7):1080-93. doi: 10.4161/auto.24709. PubMed PMID: 23697944; PubMed Central PMCID: PMC3722317.
113. Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, Kim S, Schmid-Burgk J, Cavlar T, et al. Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* (2011) 68(5):765-83. doi: 10.1007/s00018-010-0567-4. PubMed PMID: 21072676.
114. Goncalves VM, Matteucci KC, Buzzo CL, Miollo BH, Ferrante D, Torrecilhas AC, et al. NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. *PLoS neglected tropical diseases* (2013) 7(10):e2469. doi: 10.1371/journal.pntd.0002469. PubMed PMID: 24098823; PubMed Central PMCID: PMC3789781.
115. Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MC, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *Journal of immunology* (2004) 172(7):4454-62. PubMed PMID: 15034061.
116. Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, Rosner M, Zeyda M, Stuhlmeier KM, et al. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity* (2008) 29(4):565-77. doi: 10.1016/j.immuni.2008.08.012. PubMed PMID: 18848473.
117. Hallowell RW, Collins SL, Craig JM, Zhang Y, Oh M, Illei PB, et al. mTORC2 signalling regulates M2 macrophage differentiation in response to helminth infection and adaptive thermogenesis. *Nature communications* (2017) 8:14208. doi: 10.1038/ncomms14208. PubMed PMID: 28128208; PubMed Central PMCID: PMC5290163.
118. Weichhart T, Saemann MD. The multiple facets of mTOR in immunity. *Trends in immunology* (2009) 30(5):218-26. doi: 10.1016/j.it.2009.02.002. PubMed PMID: 19362054.
119. Haidinger M, Poglitsch M, Geyeregger R, Kasturi S, Zeyda M, Zlabinger GJ, et al. A versatile role of mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and differentiation. *Journal of immunology* (2010) 185(7):3919-31. doi: 10.4049/jimmunol.1000296. PubMed PMID: 20805416.
120. Weichhart T, Haidinger M, Katholnig K, Kopecky C, Poglitsch M, Lassnig C, et al. Inhibition of mTOR blocks the anti-inflammatory effects of glucocorticoids in myeloid immune cells. *Blood* (2011) 117(16):4273-83. doi: 10.1182/blood-2010-09-310888. PubMed PMID: 21368289.
121. Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O'Shea A, Sharp FA, et al. Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *The Journal of biological chemistry* (2011)

- 286(11):9587-97. doi: 10.1074/jbc.M110.202911. PubMed PMID: 21228274; PubMed Central PMCID: PMC3058966.
122. Li K, Zhang Y, Liang KY, Xu S, Zhou XJ, Tan K, et al. Rheb1 deletion in myeloid cells aggravates OVA-induced allergic inflammation in mice. *Scientific reports* (2017) 7:42655. doi: 10.1038/srep42655. PubMed PMID: 28225024; PubMed Central PMCID: PMC5320517.
123. Arranz A, Doxaki C, Vergadi E, Martinez de la Torre Y, Vaporidi K, Lagoudaki ED, et al. Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2012) 109(24):9517-22. doi: 10.1073/pnas.1119038109. PubMed PMID: 22647600; PubMed Central PMCID: PMC3386059.
124. Kuijl C SN, Marsman M, Tuin AW, Janssen L, Egan DA, Ketema M, van den Nieuwendijk R, van den Eeden SJ, Geluk A, . Intracellular bacterial growth is controlled by a kinase network around PKB/AKT1. *Nature* (2007) 450(7170). doi: 10.1038/nature06345.
125. Wills-Karp M, Finkelman FD. Untangling the complex web of IL-4- and IL-13-mediated signaling pathways. *Science signaling* (2008) 1(51):pe55. doi: 10.1126/scisignal.1.51.pe55. PubMed PMID: 19109238; PubMed Central PMCID: PMC4446705.
126. Huang SC, Smith AM, Everts B, Colonna M, Pearce EL, Schilling JD, et al. Metabolic Reprogramming Mediated by the mTORC2-IRF4 Signaling Axis Is Essential for Macrophage Alternative Activation. *Immunity* (2016) 45(4):817-30. doi: 10.1016/j.immuni.2016.09.016. PubMed PMID: 27760338; PubMed Central PMCID: PMC5535820.
127. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* (2011) 469(7329):221-5. doi: 10.1038/nature09663. PubMed PMID: 21124315.
128. Garg NJ. Inflammasomes in cardiovascular diseases. *American journal of cardiovascular disease* (2011) 1(3):244-54. PubMed PMID: 22254202; PubMed Central PMCID: PMC3253520.
129. Martinon F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur J Immunol* (2010) 40(3):616-9. doi: 10.1002/eji.200940168. PubMed PMID: 20201014.
130. Sorbara MT, Girardin SE. Mitochondrial ROS fuel the inflammasome. *Cell research* (2011) 21(4):558-60. doi: 10.1038/cr.2011.20. PubMed PMID: 21283134; PubMed Central PMCID: PMC3203657.
131. Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Nunez G, Hornung V. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *Journal of immunology* (2011) 187(2):613-7. doi: 10.4049/jimmunol.1100613. PubMed PMID: 21677136; PubMed Central PMCID: PMC3131480.
132. Hwang YS, Jeong M, Park JS, Kim MH, Lee DB, Shin BA, et al. Interleukin-1beta stimulates IL-8 expression through MAP kinase and ROS signaling in human gastric carcinoma cells. *Oncogene* (2004) 23(39):6603-11. doi: 10.1038/sj.onc.1207867. PubMed PMID: 15208668.

133. Lo YY, Conquer JA, Grinstein S, Cruz TF. Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species. *Journal of cellular biochemistry* (1998) 69(1):19-29. PubMed PMID: 9513043.
134. Singhal A, Jie L, Kumar P, Hong GS, Leow MK, Paleja B, et al. Metformin as adjunct antituberculosis therapy. *Sci Transl Med* (2014) 6(263):263ra159. doi: 10.1126/scitranslmed.3009885. PubMed PMID: 25411472.