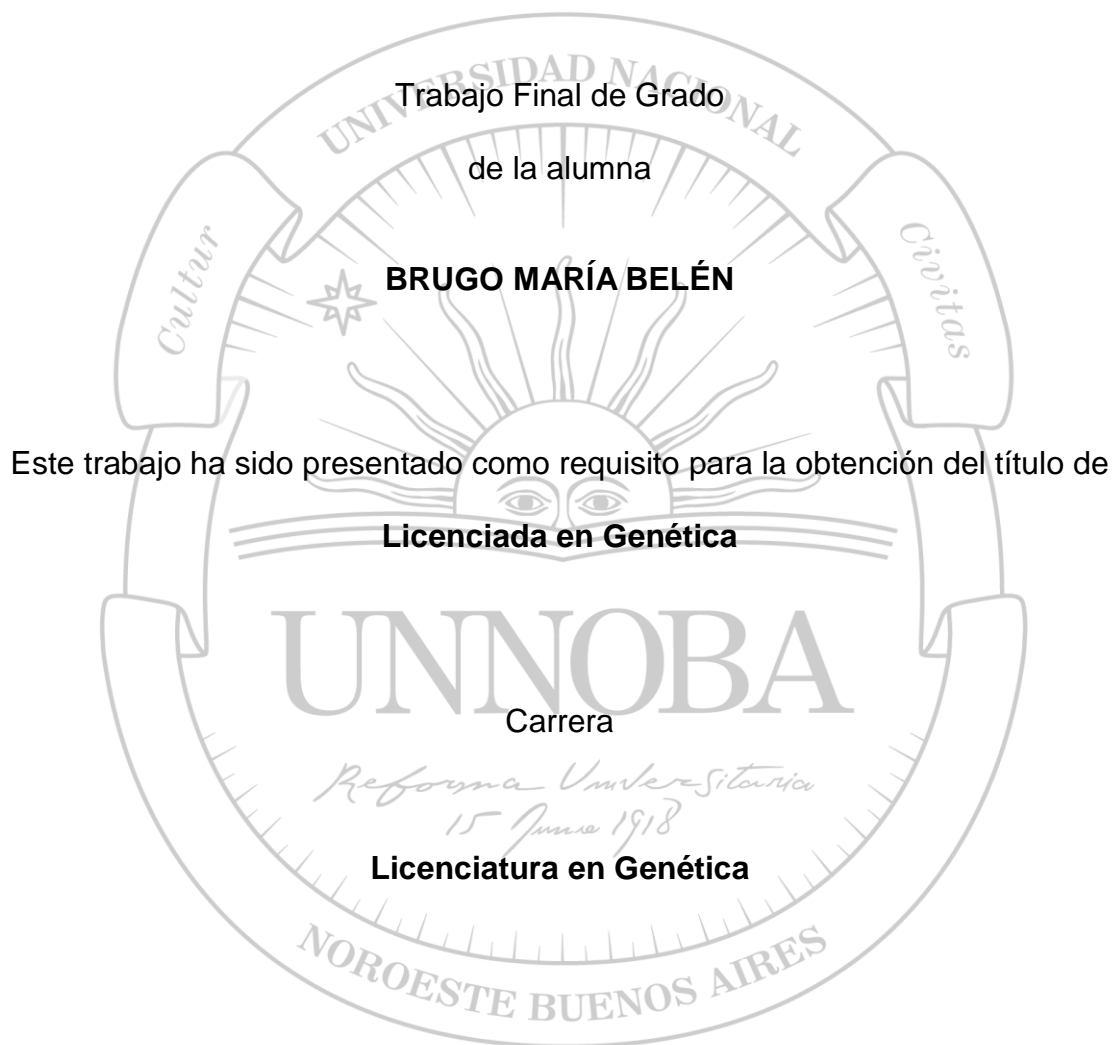


**ESTUDIO DE LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS EN LA INFECCIÓN CON *Trypanosoma cruzi*.
PARTICIPACIÓN DE AMPK Y DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN LA REPLICACIÓN DEL
PARÁSITO.**



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 9 de noviembre del 2018

**ESTUDIO DE LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS EN LA INFECCIÓN CON *Trypanosoma cruzi*.
PARTICIPACIÓN DE AMPK Y DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN LA REPLICACIÓN DEL
PARÁSITO.**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

BRUGO MARÍA BELÉN

Aprobada por el Tribunal Evaluador

María Luisa Bay

Ina Sevic

**Hernández Del Pino,
Rodrigo E.**

Evaluador

Evaluador

Evaluador

Virginia Pasquinelli

Jorge David Rojas Márquez

Fabio Marcelo Cerbán

Co-Director Interno

Co-Director

Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 9 de noviembre del 2018

ÍNDICE

ÍNDICE.....	3
GLOSARIO.....	5
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	8
LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	8
EL SISTEMA INMUNOLÓGICO.....	11
MACRÓFAGOS.....	12
MACRÓFAGOS Y <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
POLARIZACIÓN DEL MACRÓFAGO Y <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
AMPK Y POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS.....	18
ANTECEDENTES.....	20
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
MODELO ANIMAL.....	24
<i>Trypanosoma cruzi</i>	24
MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MÉDULA ÓSEA	24
INSUMOS Y REACTIVOS.....	25
MODELO DE ACTIVACIÓN.....	26
DETERINACIÓN DE CITOQUINAS.....	26
WESTERN BLOT.....	27
INMUNOFLUORESCENCIA.....	27
DETERMINACIÓN DE ON A TRAVÉS DE LA REACCIÓN DE GRIESS.....	28
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
RESULTADOS.....	29
Estudio de la modulación de la enzima AMPK durante la infección con <i>T. cruzi</i>	29
AMPK y la sobrevivencia del <i>T. cruzi</i>	30
AMPK y el balance iNOS/Arginasa durante la infección con <i>T. cruzi</i>	33

AMPK y el perfil de citoquinas.....	35
CONCLUSIONES.....	38
DISCUSIÓN.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	44

GLOSARIO

4EBP	Proteína 1 de unión a factor regulador de la iniciación de la traducción eucariótica
ACAMPs	Patrones moleculares asociados a células apoptóticas
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
CPA	Células presentadoras de antígeno
Cz	Cruzipaína
DAMPs	Señales endógenas asociadas al daño tisular
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
GPI	Glicosilfosfatidil-inositol
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenasa
IFNγ	Interferon gama
IL-4	Interleuquina 4
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LCM	Cultivo de células L929
LKB1	Quinasa del hígado B1
LPS	Lipopolisacárido
M-CSF	Factor estimulante de colonia de monocitos
MDMO	Macrófagos derivados de médula ósea
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
mTOR	Proteína de mamífero diana de rapamicina
mtROS	ROS mitocondrial
NK	Células asesinas naturales
NOHA	N(ω)-hidroxi-L-arginina
ON	Óxido nítrico
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Sodio dodecil sulfato
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es una importante causa de mortalidad y morbilidad en Sudamérica. 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 *T. 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. El fenotipo de macrófago más estudiado es el de “macrófagos activados clásicamente” o M1 los cuales se desarrollan en respuesta a estímulos pro-inflamatorios como citoquinas o productos bacterianos. Pero también encontramos macrófagos que se diferencian en presencia de citoquinas Th2 y éstos han sido denominados “macrófagos activados alternativamente” o M2. Por otro lado, la polarización de los macrófagos también puede estar influenciada por señales del medioambiente. Uno de los sensores de tales señales es la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), la cual detecta el estado de las reservas de energía celular. La metformina es un fármaco antidiabético de uso común que aumenta la actividad de AMPK y se ha demostrado que el tratamiento con metformina reduce significativamente la expresión de IL-13 y de marcadores de macrófagos M2, tales como CD206. Sin embargo, el efecto de la activación de AMPK en infecciones está muy poco estudiado.

En el presente trabajo se abordaron aspectos relacionados a la vía de señalización de AMPK y a las funciones efectoras de macrófagos murinos, relevantes tanto para la sobrevida del parásito, así como para su eliminación. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la sobrevida y replicación del *T. cruzi* en macrófagos derivados de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6, dependen del background genético de la cepa con la cual estemos trabajando. La activación con metformina de la vía de AMPK en macrófagos infectados con *T. cruzi* redujo significativamente la carga parasitaria en ambas cepas de ratones, sugiriendo que la activación de la vía es fundamental para la disminución de la sobrevida y la reducción de la replicación intracelular del parásito. Encontramos también, que la expresión de la enzima Arginasa se redujo tanto en los ratones C57BL/6 como en los BALB/c pero la iNOS (Óxido nítrico sintasa inducible) sólo aumenta su expresión y actividad en los C57BL/6. El perfil de citoquinas de los macrófagos de las dos cepas de ratones son diferentes, en los C57BL/6 encontramos un perfil M1 clásico en el cual se produjo un aumento de la producción de IL-12 y TNF- α

mientras que los BALB/c posee un perfil “M1 like” caracterizado por la producción de IL-1 β e IL-10.

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.

Palabras clave: Macrófago, *Trypanosoma cruzi*, AMPK, Metformina.

INTRODUCCIÓN

LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Con una incidencia anual de 30.000 casos vectoriales en la región de América y 9.000 recién nacidos infectados durante el embarazo, la enfermedad de Chagas afecta a unas 6 millones de personas y provoca, en promedio, alrededor de 14.000 muertes al año [1].

Aunque esta enfermedad es endémica de 21 países de América Latina (Figura 1), incluida Argentina, los cambios ambientales actuales y el aumento de las migraciones en un mundo cada vez más globalizado, facilitan la dispersión del parásito hacia diferentes regiones del planeta [1] [2].

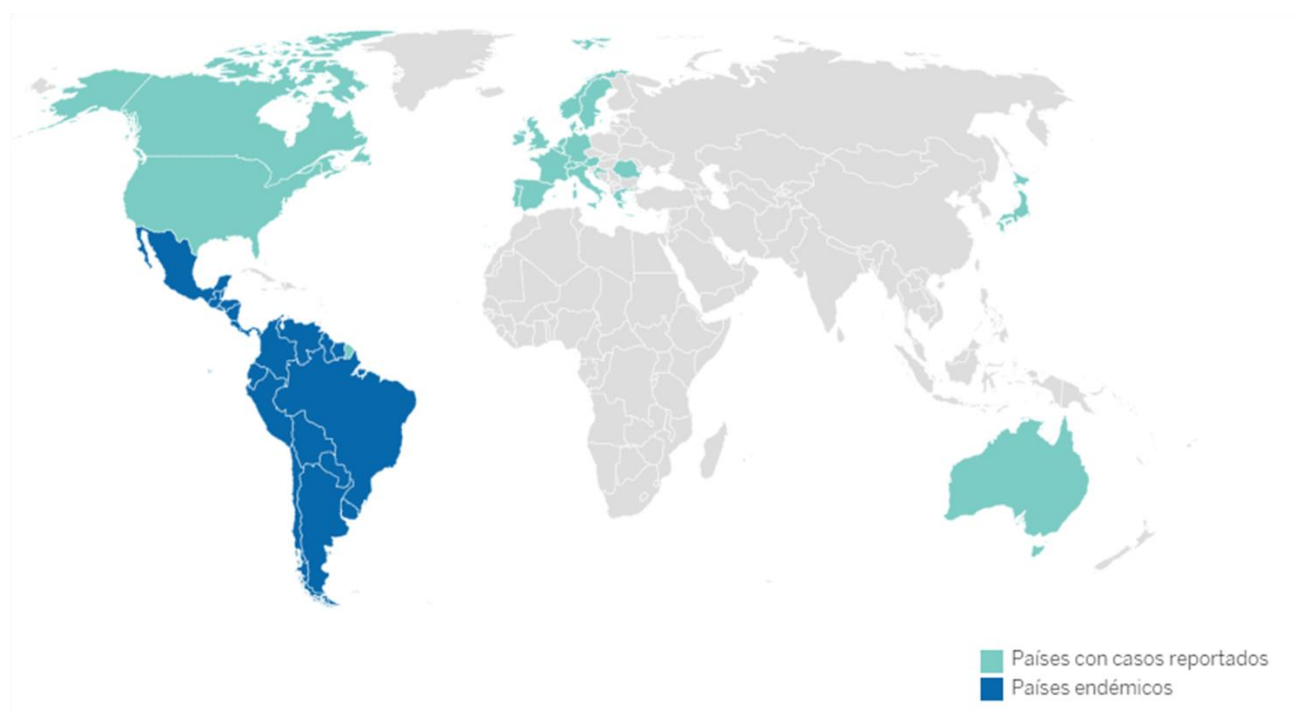


Figura 1| Países endémicos y donde se encuentra presente la tripanosomiasis americana. En verde se aprecian los países con casos reportados y en azul los que son endémicos de la enfermedad. Extraída de OMS

La enfermedad de Chagas puede causar consecuencias irreversibles y crónicas en el sistema nervioso, el sistema digestivo y el corazón. Se calcula que alrededor de 70 millones de personas en América viven en áreas de exposición y están en riesgo de contraer esta enfermedad [3]. Por lo tanto, ésta constituye un importante problema para la salud pública, no sólo por su prevalencia sino también por los altos costos para su tratamiento y prevención [4] [5].

El curso de esta infección tiene dos fases claramente diferenciadas: la fase aguda y la fase crónica. Inicialmente, la fase aguda dura unos dos meses después de contraerse la infección. Durante esta fase circulan por el torrente sanguíneo una gran cantidad de parásitos. En la mayoría de los casos no hay síntomas o estos son leves y no específicos. Un signo inicial característico puede ser una lesión cutánea o una hinchazón amoratada de un párpado. Además, pueden presentar fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, dolores musculares, dificultad para respirar, hinchazón y dolor abdominal o torácico. En la fase crónica, los parásitos permanecen ocultos principalmente en el músculo cardíaco y digestivo. Hasta un 30% de los pacientes sufren trastornos cardíacos y hasta un 10% presentan alteraciones digestivas (típicamente, agrandamiento del esófago o del colon), neurológicas o mixtas. Con el paso de los años, la infección puede causar muerte súbita por arritmias cardíacas o insuficiencia cardíaca progresiva por destrucción del músculo cardíaco y sus inervaciones [1].

Existen distintas formas de contagio de la enfermedad de Chagas. Entre ellas encontramos la transmisión por vía vectorial (a través de las heces del insecto), por vía vertical o congénita (de madre a hijo, durante el embarazo), por transfusiones sanguíneas y trasplantes de órganos, por vía oral (al ingerir comida o bebida contaminada por el parásito) y por accidentes en el laboratorio.

La transmisión vectorial (Figura 2) es la más común de todas y forma parte del ciclo natural del parásito *T. cruzi*, el cual transcurre entre los hospedadores insectos y los hospedadores vertebrados. Durante el mismo, el *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 triatómino. Los epimastigotes se diferencian y replican en el lumen del intestino proximal del insecto vector, y a medida que se dirigen hacia el intestino distal, los epimastigotes comienzan a transformarse en tripomastigotes metacíclicos (la forma infecciosa en el hospedador vertebrado) alojándose junto a las heces en la ampolla rectal del insecto. Teniendo presente que los triatóminos 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 sus células nucleadas, 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 a 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 es capaz de lisar 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 otro triatomino que necesite alimentarse. Cuando los tripomastigotes sanguíneos alcanzan el estómago del insecto, comienzan a transformarse nuevamente en epimastigotes [6].

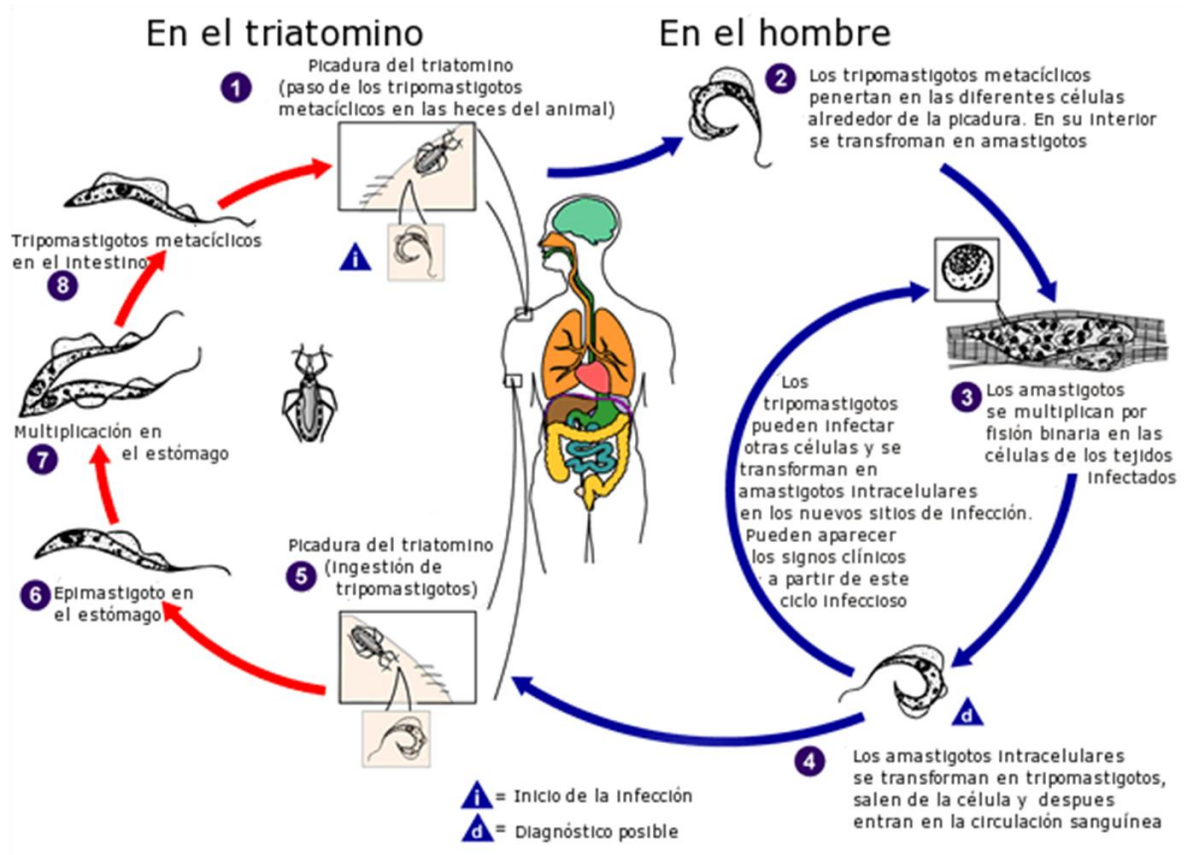


Figura 2 | Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* en triatominos y en el humano. Extraída y modificada de CDC. El insecto vector triatomo infectado se alimenta de sangre y libera a los tripomastigotes en las heces cerca del sitio de mordedura del insecto. Los tripomastigotes penetran al hospedador a través de la herida o de la membrana mucosa intacta, como la conjuntiva **(1)**. Dentro del huésped, los tripomastigotes invaden a las células, donde se diferencian en amastigotes intracelulares **(2)**. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria **(3)**, se diferencian en tripomastigotes y se liberan a la circulación sanguínea **(4)**. Los tripomastigotes infectan una gran variedad de tejidos y se transforman en amastigotes intracelulares en los nuevos sitios de infección. Los tripomastigotes circulantes en sangre no se replican. La replicación se reinicia cuando el parásito entra a otra célula o es ingerida por otro vector. El triatomo se infecta al alimentarse de la sangre humana o animal que contiene parásitos circulantes **(5)**. Los tripomastigotes ingeridos se transforman en epimastigotes en el estómago del vector **(6)**. Los parásitos se multiplican y se diferencian en el estómago **(7)** y se transforman en tripomastigotes metacíclicos infectantes en el intestino grueso **(8)**.

ELSISTEMA INMUNOLÓGICO

La función esencial del sistema inmune es proteger al huésped contra agentes extraños, infecciosos y microorganismos presentes en el ambiente. Para esto cuenta con dos tipos de defensa: innata y adaptativa [7] (Figura 3). El sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa que sirve para limitar la infección en el momento más temprano después de la exposición a diferentes patógenos [8]. Este sistema de defensa incluye componentes celulares y humorales entre los que se encuentran células epiteliales, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células NK, además, de componentes del sistema del complemento, una gran variedad de citoquinas y moléculas solubles. Las células del sistema inmune innato pueden reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen associated molecular patterns* PAMPs) y señales endógenas asociadas al daño tisular (*Damage associated molecular patterns* DAMPs) a través de los denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales le permiten montar una respuesta adecuada a este tipo de señales de peligro [9].

El sistema innato se complementa con el sistema inmune adaptativo que genera respuestas antígeno-específicas y confiere memoria inmunológica tras el primer contacto con el antígeno. La respuesta inmune adaptativa está mediada por componentes celulares, los linfocitos T y B, y componentes de tipo humoral, como es la respuesta mediada por anticuerpos. Las células presentadoras de antígeno (CPA), en especial células dendríticas y macrófagos, juegan un papel fundamental en la conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, ya que son las responsables de procesar y presentar antígenos a los linfocitos T en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presentes en su superficie. En consecuencia, el sistema inmune innato además de tener como función el reconocimiento y la contención de

patógenos, estimula y polariza la respuesta inmune adaptativa con objeto de optimizar la eliminación del patógeno y minimizar los daños tisulares colaterales [11].

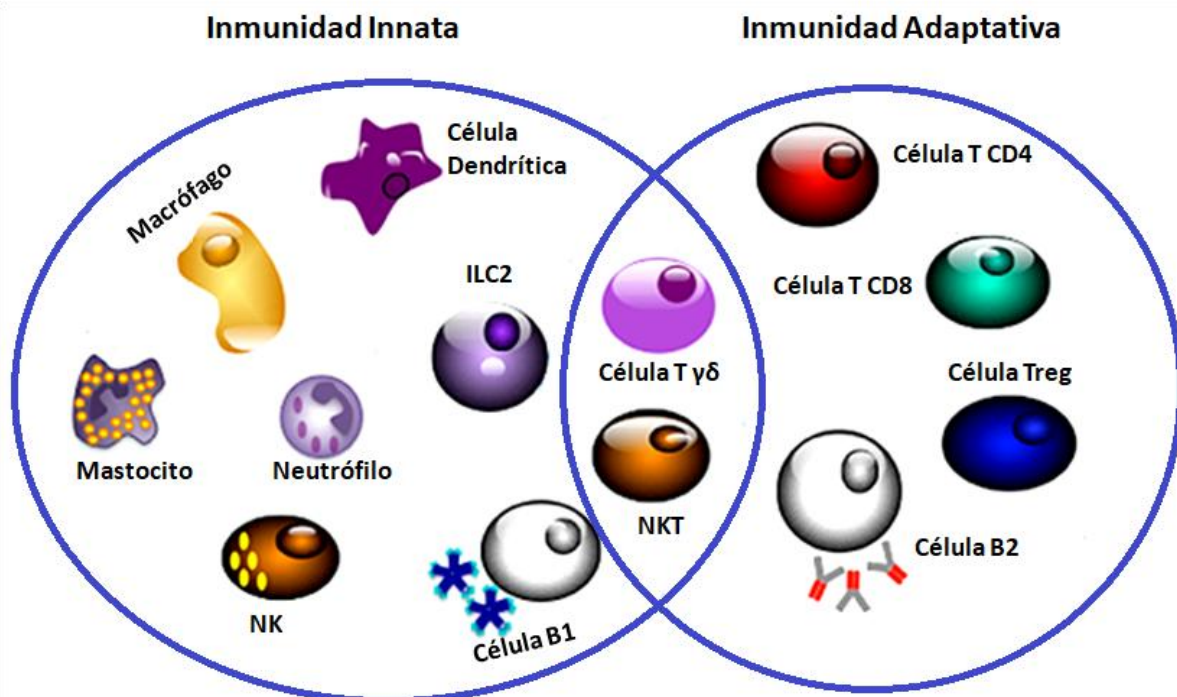


Figura 3 | Esquema representativo de las células involucradas en la inmunidad innata y la adquirida. Abreviaturas: ILC2 (células linfoides innatas de tipo 2); NK (células *natural killer*); y Treg (células T reguladoras). Extraída y modificada de Tedgui [12].

MACRÓFAGOS

Los macrófagos juegan un papel crítico en el desarrollo de la respuesta inmunitaria, dado que son una de las primeras poblaciones celulares en aparecer, detectar y eliminar partículas “extrañas” (microorganismos, macromoléculas tóxicas, células propias dañadas o muertas) mediante fagocitosis, secreción de enzimas, citoquinas o producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) [13]. Durante la respuesta inmunitaria adaptativa, los macrófagos además, como se ha mencionado anteriormente, presentan antígenos a los linfocitos T en el contexto de MHC-II y/o MHC-I, y colaboran con la respuesta humoral en la eliminación de los agentes extraños. Los macrófagos tienen también un papel importante en los procesos de reparación y resolución de la inflamación, reclutando células del sistema inmune hacia los focos de inflamación, incluidos otros macrófagos, para promover los procesos de remodelación de la matriz extracelular y angiogénesis. En consecuencia, el término “macrófago” describe un tipo de

células cuya finalidad principal es el mantenimiento de la homeostasis y la integridad tisular [14].

Los macrófagos derivan en parte de monocitos circulantes que se extravasan a los tejidos por la influencia de citocinas y quimiocinas. Hay también un porcentaje de macrófagos residentes en los tejidos (aproximadamente 10%) que no derivan de los monocitos circulantes.

Los macrófagos son células multifuncionales y heterogéneas presentes en los tejidos, donde monitorizan el microambiente local. Estos macrófagos expresan un amplio repertorio de receptores: *scavenger*, de reconocimiento de patógenos y de citocinas. Además estos macrófagos, desempeñan varias funciones tejido-específicas lo que hace que tengan un gran diversidad fenotípica [15]. También los macrófagos pueden tener una polarización funcional como respuesta a señales medioambientales [16]. Los programas de polarización más conocidos de los macrófagos son: la activación clásica (M1) y la activación alternativa (M2) (Figura 4).

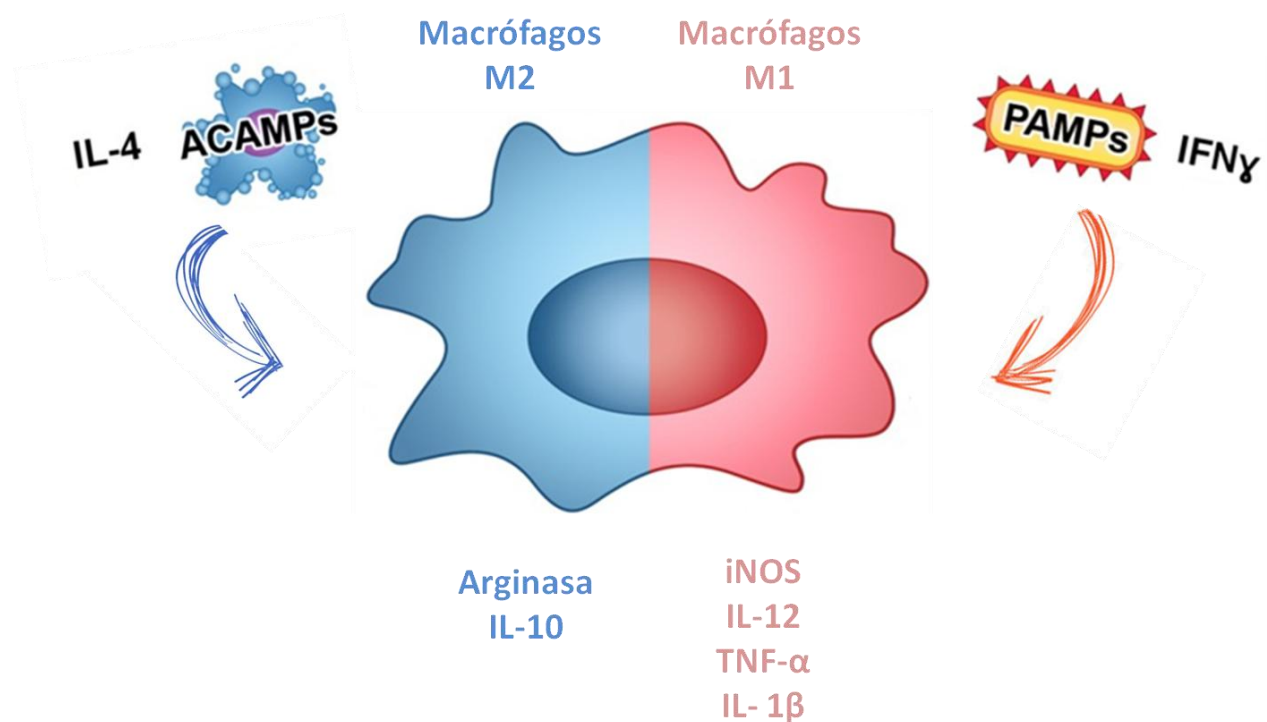


Figura 4 | Perfil de los macrófagos. Los macrófagos M1 son inducidos por IFN γ o PAMPs y se caracterizan por la producción de iNOS y citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β e IL-12. Los macrófagos M2 son inducidos por IL-4 y caracterizados por la producción de arginasa y citoquinas antiinflamatorias como IL-10. Las células apoptóticas (ACAMPS: patrones moleculares asociados a células apoptóticas) modulan la producción de citoquinas en macrófagos hacia un fenotipo antiinflamatorio. Extraído y modificado de Fraser y col. [17]

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 prolina [18] [19]. 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 (Óxido nítrico sintasa inducible) [20] [18]. Este tipo de macrófago se caracteriza por una elevada actividad fagocítica y la expresión de CD23 y del receptor de manosa. Los fenotipos alternativos son blanco de varios parásitos celulares obligados como el *T. cruzi*, que los utilizan como nicho de reproducción [20] [21] [22] 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.

Los macrófagos activados clásicamente son conocidos 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 óxido nítrico (ON), especies reactivas del oxígeno y quinureninas, entre otros compuestos microbicidas [23] [24]. 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. 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 [25] [26] [27] [23] [24]. 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 la producción de ON. Dentro de estos mecanismos podemos mencionar a la enzima IDO (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 [28] [29]. 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. 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 [30] [31]. 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 [13] [26] [27] [28] [32] [33] [34].

MACRÓFAGOS Y *Trypanosoma cruzi*

El *T. cruzi* es un parásito representado por diferentes cepas con gran variabilidad genética entre ellas, y donde cada una está constituida por varios clones que pueden tener diferencias en el comportamiento de acuerdo a la interacción molecular con las diferentes células que invaden, según sea el hospedador vertebrado o el insecto vector [35].

La infección del hospedador requiere de su habilidad para evadir los mecanismos extra e intracelulares de defensa como la activación de la cascada del complemento, de la opsonización y lisis del parásito, al tiempo que, debe llevar a cabo un reconocimiento celular, unirse a la célula diana y lograr penetrar en ella. Una vez adentro, el parásito debe evadir los mecanismos microbicidas intracelulares, multiplicarse, transformarse, salir e invadir otras células para continuar con su ciclo [36].

La invasión de células fagocitarias y en especial de los macrófagos por *T. cruzi* depende de la habilidad del parásito de reconocer receptores moleculares tipo lectinas y receptores de la familia de las integrinas de la membrana celular [37] [38] [39]. Las formas metacíclicas dentro de la célula dan origen a la formación de una vacuola parasitófora debido a la unión estrecha de las membranas celular y lisosomal en el mismo lugar donde

la membrana parasitaria se une. En cuanto a la evasión por parte del parásito a los mecanismos de defensa intracelular, cabe destacar que *T. cruzi* escapa de la vacuola parasitófora. El escape es facilitado por la acción lítica de una toxina TC-TOX formadora de poros, la cual es secretada por el parásito. Los tripomastigotes dentro de la célula por la acción de la proteasa de cisteína, (cruzipaína), se transforman en amastigotes que se multiplican rápidamente en un número de divisiones probablemente programadas, después del cual los amastigotes se transforman en tripomastigotes que comienzan un movimiento intenso hasta que se produzca la ruptura de la célula con la liberación de cientos de parásitos al espacio intracelular. Estos parásitos son capaces de invadir nuevas células en el mismo sitio donde fueron liberados o salir al torrente sanguíneo y distribuirse por todo el organismo. La infección y la sobrevivencia del *T. cruzi* están relacionadas con proteínas y glicoconjugados que median la interacción parásito-hospedero. La mayoría de estas moléculas son ancladas a la membrana por el glicosilfosfatidil-inositol (GPI). En las células infectadas, como los macrófagos activados, el *T. cruzi* sobrevive neutralizando los derivados tóxicos del oxígeno producidos por el estallido respiratorio, e inhibiendo la síntesis del ON [40].

Los parásitos también pueden modular la apoptosis celular dado que su activación puede favorecer la liberación de las formas de tripomastigotes una vez que hayan cumplido su transformación intracelular. Además la apoptosis está involucrada en la resolución de la respuesta inflamatoria característica de la infección chagásica, ya que los neutrófilos sufren apoptosis y pueden entonces ser fagocitados por los macrófagos [41].

La producción de citoquinas por parte del hospedador como péptidos moduladores de la respuesta inmune, también puede ser alterada por los parásitos, los cuales inducen la producción de citoquinas que en muchos casos van a inhibir la muerte parasitaria. El IFN γ es muy eficiente para promover la muerte del parásito por parte de los macrófagos activados. Por otra parte, la IL-10 y TGF- β inhiben la acción tripanocida de los macrófagos activados, lo que favorece el establecimiento de los parásitos.

POLARIZACIÓN DEL MACRÓFAGO Y *Trypanosoma cruzi*

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 [42] [20] [21]. 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 o el fenotipo alternativo. 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 prolinas, asegurando la sobrevivencia de su descendencia. Existe una fina regulación 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 5). En este sentido, ha sido descrito que NOHA (N(ω)-hidroxi-L-arginina), 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 [43] [44] [45] [46]. 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 [47]. 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 (*cationic amino acid transporters*) 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 [18] [19]. Por lo tanto, 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.

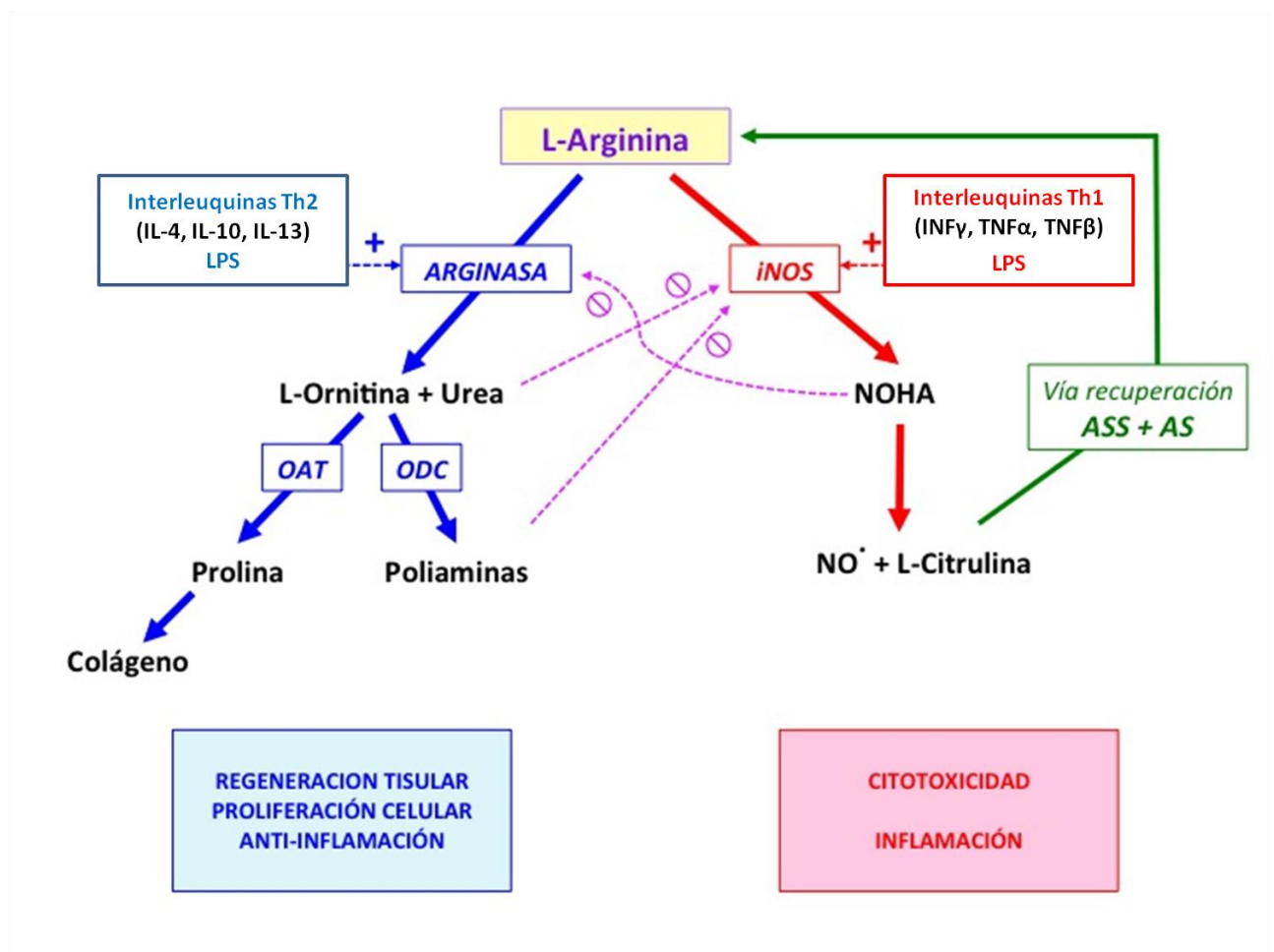


Figura 5 | Posibles destinos de la L-arginina en macrófagos a través de la arginasa o de la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS). El primero favorece una función proliferativa, antiinflamatoria, y regenerativa, mientras que el segundo activa los mecanismos de defensa inflamatoria y citotóxica. Abreviaturas: Arginosuccinato sintetasa (ASS), arginosuccinasa (AS), ornitina aminotransferasa (OAT), ornitina descarboxilasa (ODC), N(ω)-hidroxi-L-arginina (NOHA). Extraído de Germán Soler [48]

AMPK Y POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS

La insuficiencia de energía aumenta la relación de AMP/ATP, lo que lleva a una interacción entre AMP y la subunidad reguladora de AMPK. Esta asociación induce un cambio conformacional en AMPK que le permite ser fosforilada y activada por sus proteínas quinasas específicas. Por lo tanto, la activación de AMPK señala al interior citoplasmático que su suministro de energía es insuficiente. La metformina, es un fármaco antidiabético de uso común que aumenta la actividad de AMPK [49] [50] (Figura 6). Se ha demostrado que el tratamiento con metformina reduce significativamente la expresión de IL-13 y de marcadores de macrófagos M2, tales como CD206 [50]. La metformina se

asocia con la disminución de la incidencia de cáncer [51] [52] [53] y debido a su excelente seguridad en pacientes diabéticos, la evaluación clínica de la metformina por sus efectos quimio-preventivos y antineoplásicos ha pasado por alto la evaluación tradicional de fase I y ha avanzado directamente a los ensayos de fase II y fase III en varios cánceres [54] [55]. La activación de AMPK mediada por metformina conduce a una inhibición de la señalización de mTOR, a una reducción en la fosforilación de sus principales efectores descendentes 4E-BPs y SK6Ks [56]. En un trabajo previo hemos estudiado la participación de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) en la polarización de macrófagos en la infección con *T. cruzi* [57]. En el mismo concluimos que *T. cruzi* puede activar mTOR, siendo esta molécula importante para su supervivencia, ya que la inhibición de mTOR disminuyó la carga de parásitos en los macrófagos. Sin embargo, el efecto de la activación de AMPK en infecciones está muy poco estudiado.

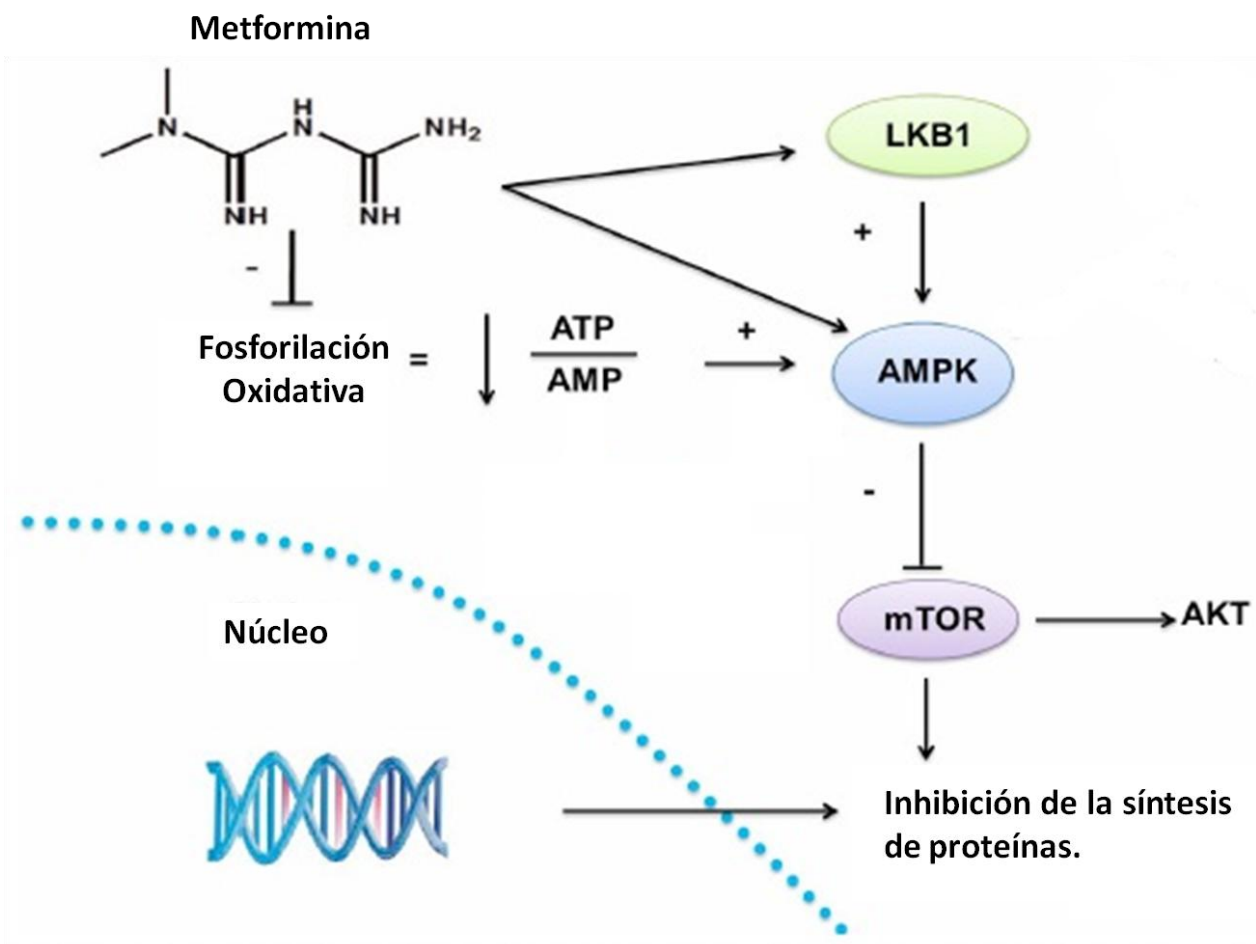


Figura 6 | Metformina y AMPK. La metformina puede activar AMPK a través de dos mecanismos separados, la inhibición del transporte de fosforilación oxidativa y la disminución posterior en la relación ATP/AMP y/o la activación directa de LKB1 (*liver kinase B1*). Además la activación de AMPK produce efectos inhibidores sobre la síntesis de proteínas, a través de la inhibición de mTOR. Extraída y modificada de Ismael Samudio y col. [58]

ANTECEDENTES

En nuestro grupo iniciamos el estudio de las vías de activación del macrófago a través de interacciones de este tipo celular con *T. cruzi* o con un antígeno inmunogénico de este protozoario, denominado cruzipaína (Cz). Cz es una glicoproteína de origen lisosomal, que ha sido ampliamente caracterizada [59]. Durante estos estudios demostramos que Cz es capaz de activar alternativamente a los macrófagos. Este perfil de activación se caracteriza por un incremento en la actividad y expresión de arginasa I y por un bloqueo en la expresión de iNOS. Además, Cz es capaz de inhibir la producción de ON e IL-12 en macrófagos activados con LPS. Por otro lado, macrófagos tratados con Cz liberan IL10 y TGF- β , los cuales también son marcadores de la activación alternativa. Es interesante notar que nuestro trabajo fue el primero en identificar un antígeno parasitario capaz de gatillar la activación alternativa de macrófagos *in vitro* [60].

Además, en nuestro grupo determinamos cuál es el rol biológico de estos macrófagos activados alternativamente frente a *T. cruzi*. Demostramos que los macrófagos activados previamente con Cz favorecen la replicación intracelular del parásito a niveles similares a los encontrados en las células tratadas con IL-4. Estos datos sugirieron que este perfil de activación del macrófago, inducido por Cz, se encuentra asociado a una habilidad funcional de estas células para promover el crecimiento intracelular del parásito [60] [61] [62]. Este podría ser un mecanismo de evasión de la respuesta inmune innata utilizado por el *T. cruzi* para favorecer su supervivencia en el hospedador [63] [21] [42] [64].

Se ha reportado que la enzima arginasa (marcador clave de los macrófagos M2) es inducida durante infecciones parasitarias. De este modo, el patógeno inhibiría los mecanismos de muerte dependientes de ON y encontraría metabolitos que promueven su crecimiento [65] [66]. En modelos animales de infección con los helmintos *Brugia malayi*, *Taenia solium* y *Schistosoma mansoni* se ha encontrado que los macrófagos activados alternativamente presentan actividad de arginasa [65] [66]. También se ha demostrado la presencia de los mencionados anteriormente en etapas crónicas de la infección con protozoarios como el *Trypanosoma brucei* [65] [66] [67] [68] [69] [70] [71]. De esta manera y debido a que los macrófagos son usados como un nicho intracelular por varias bacterias y protozoarios, estos patógenos adoptan diversas estrategias para evadir los efectos microbicidas de los macrófagos [18] [19] [72] [73] [74].

Como se ha mencionado anteriormente, nuestro grupo de trabajo ha estudiado la participación de mTOR en la polarización de macrófagos en la infección con *T. cruzi* [57]. En el mismo concluimos que *T. cruzi* puede activar mTOR, siendo esta molécula importante para su supervivencia (Figura 7).

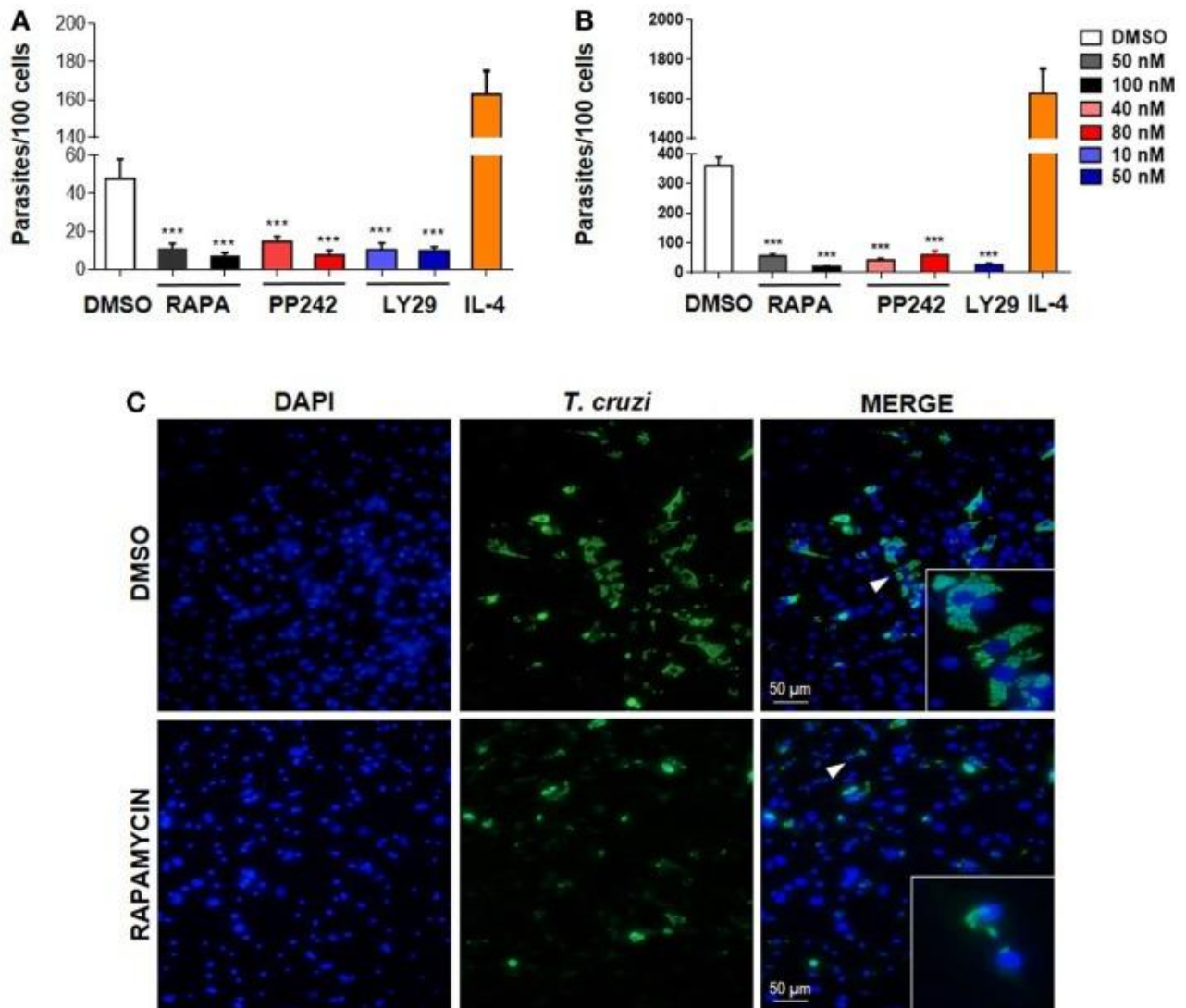


Figura 7 | La activación de mTOR en los macrófagos es esencial para la replicación del parásito. (a) Macrófagos derivados de medula ósea (MDMO) y (b) peritoneales de ratones BALB/c fueron pretratados con DMSO (como control), o fueron pretratados con diferentes inhibidores de mTOR: rapamicina (50 o 100 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. 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). (c) Una imagen representativa de MDMO 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. Extraída de Jorge David Rojas Márquez [57]

También demostramos que la inhibición de mTOR en macrófagos infectados por *T. cruzi* activa el inflammasoma NLRP3, induce la producción de IL-12, IL-6, TNF- α , IL-1 β y ROS mitocondrial (mtROS), pero regula negativamente la producción de IL-10 y ON, como así también la actividad y expresión de arginasa e iNOS. Estos resultados indican que la activación de mTOR inducida por el parásito puede ser importante para inducir un fenotipo M2 que favorezca la replicación del parásito. Por el contrario, la inhibición de mTOR en macrófagos infectados con *T. cruzi* induce un fenotipo inflamatorio “M1-like” que fue capaz de limitar la replicación del parásito.

La activación de AMPK mediada por metformina conduce a una inhibición de la señalización de mTOR, lo cual podríamos suponer que produce una disminución de la carga parasitaria si tenemos en cuenta lo mencionado arriba. Existe un trabajo previo que indica que la activación de AMPK con metformina restringe el crecimiento intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos [75] a través de la producción de ROS mitocondrial. Por otro lado, también existe otro trabajo que muestra un rol antioxidante (en tejido cardíaco de ratones infectados con *T. cruzi*) de AMPK cuando es activada por resveratrol [76]. Por lo tanto, hemos decidido estudiar la relevancia de la enzima AMPK en macrófagos infectados con *T. cruzi* y así conocer mejor cual es la importancia de la misma en la polarización de los macrófagos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Debido a lo expuesto anteriormente la hipótesis planteada para el presente trabajo es,

La activación de AMPK mediada por metformina produce la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M1 y la modulación del balance iNOS/arginasa permitiendo de este modo el control de la replicación del parásito.

OBJETIVO GENERAL

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

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Estudiar la modulación de la enzima AMPK durante la infección *in vitro* de macrófagos con *T. cruzi*.

b) Estudiar el efecto del tratamiento con metformina (activador de AMPK) en la polarización de macrófagos infectados con *T. cruzi*.

MODELO ANIMAL

Los ratones BALB/c fueron adquiridos de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA, Buenos Aires, Argentina). 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 y 2018-696) [77].

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 [78].

MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MÉDULA ÓSEA

Para obtener los macrófagos derivados de médula ósea (MDMO), la médula ósea se extrajo de los huesos del fémur y la tibia de ratones BALB/c y C57BL/6, se resuspendió en RPMI 1640 frío, que contenía 40 µg/ml de gentamicina, siguiendo procedimientos estándares [79]. Estas células progenitoras de médula ósea recuperadas se cultivaron en placas para bacterias de 100 mm, que contenía SFB 10%, 40 µg/ml de gentamicina, L-glutamina 2 mM y medio condicionado derivado del cultivo de células L929 (LCM) al 30% (como fuente de M-CSF (Factor estimulante de colonia de monocitos)), durante 4 días [80]. Luego, los progenitores de médula ósea se suplementaron con RPMI + LCM al 30%. Al día 6, los MDMO se encuentran listos para ser utilizados (Figura 8).

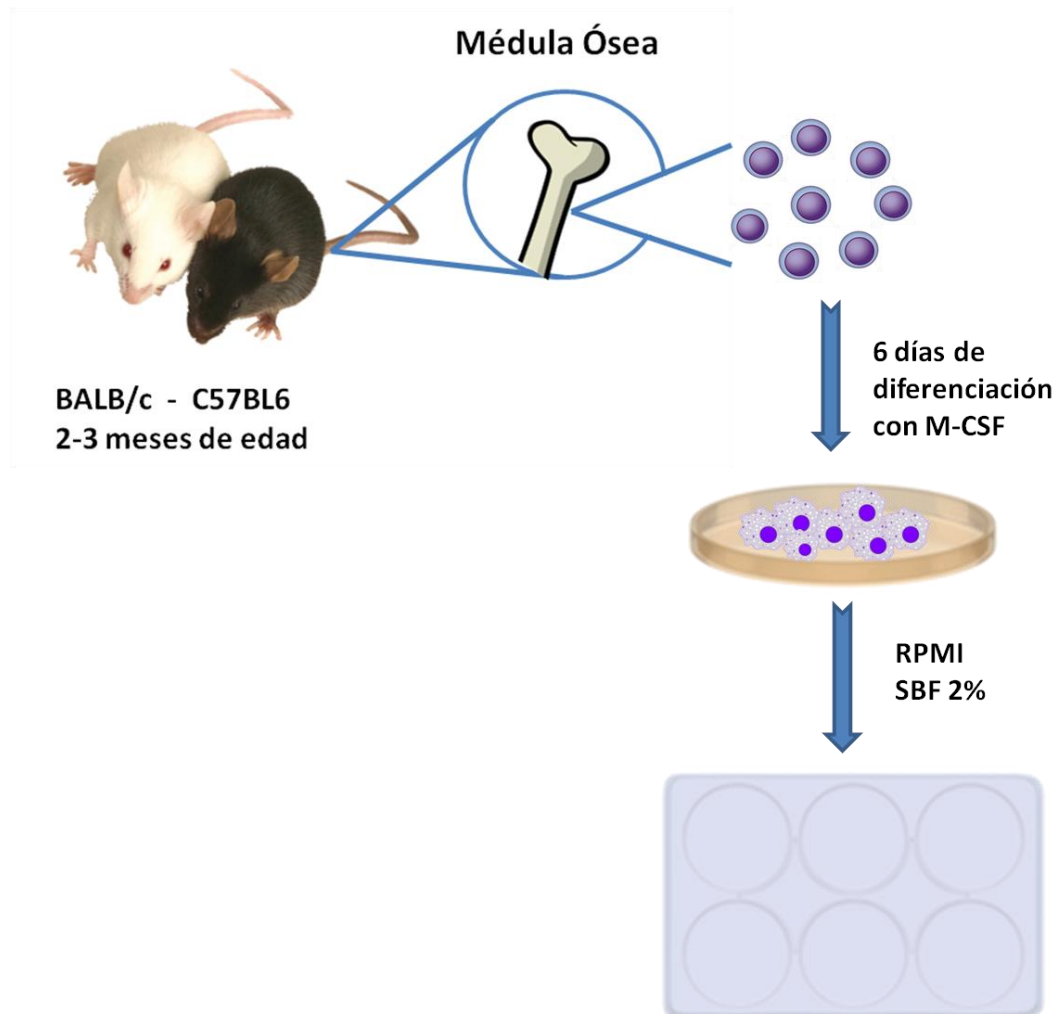


Figura 8 | Modelo de obtención de macrófagos derivados de medula ósea.

INSUMOS Y REACTIVOS

El dimetilsulfóxido (DMSO), reactivo de Griess, 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), ATP e Inhibidor de fosfatasas "PhosphoStop" fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Fluorsave fue obtenido de Calbiochem (Darmstadt, Alemania). Interferon gama (IFN γ), interleuquina 4 (IL-4), kits de ELISA sándwich para IL-10, IL12p70, TNF α , e IL-1 β fueron obtenidos de BioLegend (San Diego, California, USA). El marcador de peso molecular fue obtenido de Thermo Fisher Scientifics (Waltham, MA, USA). Los anticuerpos para Western Blot anti Arginasa I e iNOS, fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Palo Alto, California, USA). Los anticuerpos de Western Blot anti β -actina y anti-pAMPK fueron adquiridos de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, 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 Biocientífica (Buenos Aires, Argentina). El coctel de inhibidores fue adquirido en Roche (Basilea, Suiza). La metformina fue obtenida de Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA). El LPS (InvivoGen) se obtuvo de Invitrogen (Carlsbad, California, USA).

MODELO DE ACTIVACIÓN

Activación de la vía de AMPK. Macrófagos derivados de medula ósea, obtenidos de ratones BALB/c y C57BL/6, fueron tratados con metformina (1 mM). La metformina fue resuspendida en RPMI SBF 2%, y cultivada junto con los macrófagos durante 4 horas. A continuación, los macrófagos fueron lavados 3 veces con PBS temperado para remover la metformina, y fueron preparados para los estímulos correspondientes de cada experimento.

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

DETERINACIÓN 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 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 detección 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.

WESTERN BLOT

Los macrófagos derivados de médula ósea, 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 de 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 [81]. Cada lisado de proteínas fue utilizado a continuación para preparar 40 µg 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 a 150 V durante 1 hora. 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 [78]. Posteriormente, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti Arginasa I, anti iNOS, anti AMPK; y como control de carga anti β-actina. Luego de 3 lavados, cada membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o anti IgG de conejo fluorescente 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.

INMUNOFLUORESCENCIA

Los experimentos se llevaron a cabo cultivando 3×10^5 MDMO en diferentes condiciones experimentales, 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 SFB 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.

DETERMINACIÓN DE ON A TRAVÉS DE LA REACCIÓN DE GRIESS

Sobrenadantes obtenidos a partir de MDMO cultivados en diferentes condiciones experimentales, fueron colectados y junto con la dilución del estándar de nitrito de sodio, fueron incubados en oscuridad con el reactivo de Griess [82]. La reacción fue medida a una absorbancia de 540 nm, en lector de microplacas.

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.

RESULTADOS

Estudio de la modulación de la enzima AMPK durante la infección con *T. cruzi*.

Se ha observado que la activación de la AMPK con metformina restringe el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* en macrófagos [75]. Por lo cual decidimos evaluar si la activación de la enzima AMPK en la infección *in vitro* con *T. cruzi* producía un efecto similar. Para ello, utilizamos macrófagos de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6, los cuales fueron pretratados con el fármaco metformina y posteriormente infectados con *T. cruzi*. Además, los macrófagos fueron estimulados con LPS + IFN γ o IL-4 los cuales fueron utilizados como controles positivos de los fenotipos M1 y M2 del macrófago respectivamente. Luego, se recolectaron las células y se lisaron para evaluar la fosfoproteína, pAMPK, por Western blot.

Como se observa en la Figura 9, los macrófagos derivados de médula ósea de los ratones C57BL/6 tratados con metformina y también infectados mostraron un aumento significativo de la expresión de la AMPK respecto a los demás tratamientos. En contraste, los macrófagos derivados de médula ósea de los ratones BALB/c no presentaron diferencias significativas entre los que fueron tratados con metformina e infectados y aquellos que solo habían sido estimulados con el parásito. Aunque podemos observar que cuando se infecta a los macrófagos con *T. cruzi* aumenta la expresión de la AMPK.

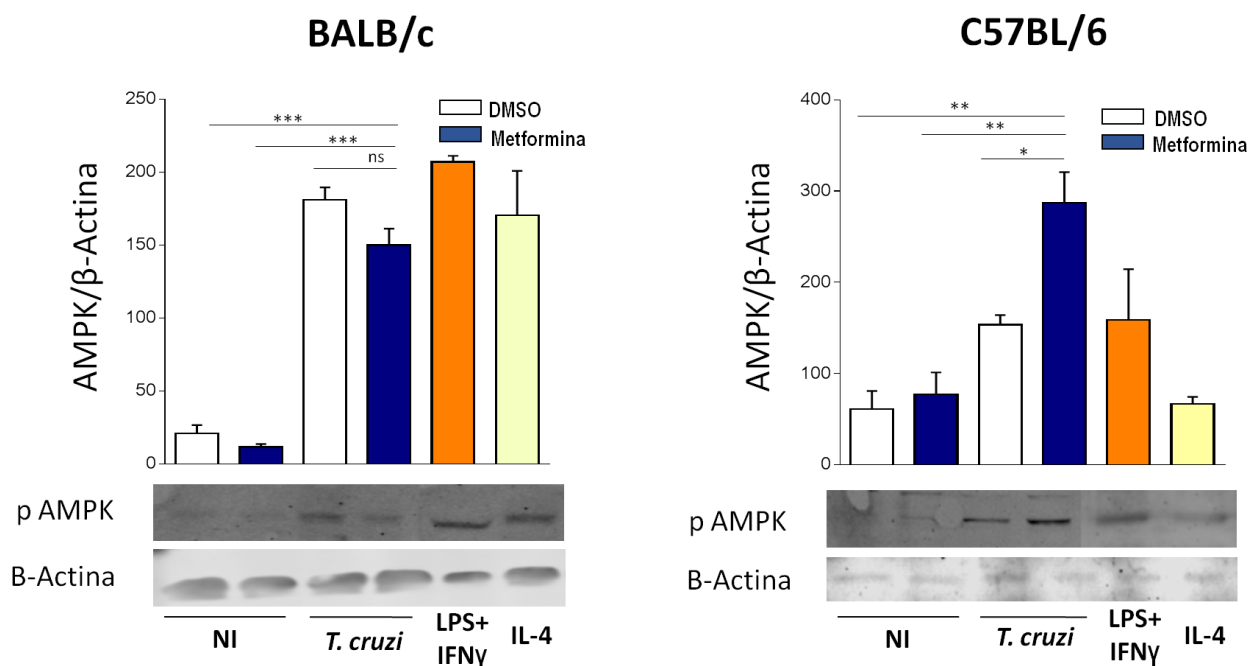


Figura 9 | Estudio de la modulación de la enzima AMPK durante la infección con *T. cruzi*. La activación de la vía de AMPK fue evaluada a través de Western Blot, utilizando como control de carga β -actina. Macrófagos derivados de médula ósea, obtenidos a partir de ratones BALB/c y C57BL/6 fueron pretratados con DMSO como control, o con metformina (1 mM) durante 4 horas. 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 macrófagos derivados de médula ósea 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 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 <0.05; ** p <0.001; *** p <0.001; ns= no significativo).

AMPK y la sobrevida del *T. cruzi*

Para determinar si la actividad de la vía de AMPK se encuentra involucrada en la respuesta contra el *T. cruzi*, nuestro siguiente objetivo fue evaluar la sobrevida del parásito en macrófagos tratados con metformina y sin tratamiento. Para ello realizamos inmunofluorescencias en las cuales fueron analizadas el número de células infectadas, así como también el número de amastigotes dentro de cada célula como indicadores de la sobrevida del parásito. En la Figura 10 podemos observar un aumento de la carga parasitaria en ambas cepas cuando los macrófagos fueron incubados con IL-4 y una clara reducción de la cantidad de parásitos por célula cuando fueron tratados con LPS más IFN γ . Al observar los macrófagos que fueron incubados con metformina, estos presentan una reducción significativa de la carga parasitaria cuando se los compara con los macrófagos control sin pretratamiento.

a .

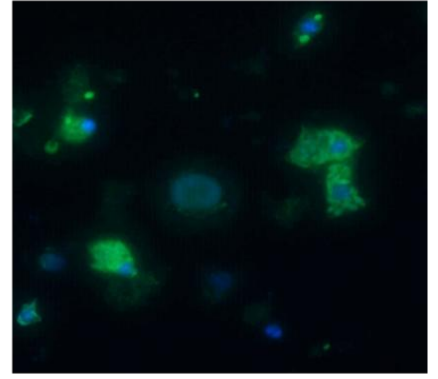
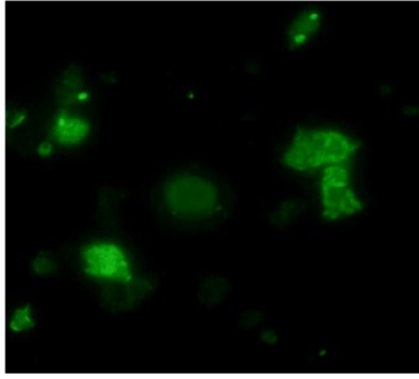
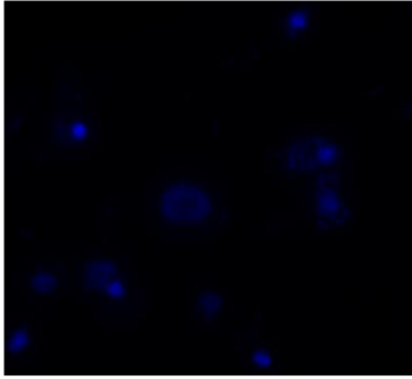
BALB/c

DAPI

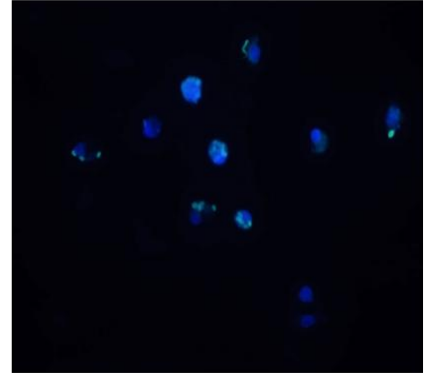
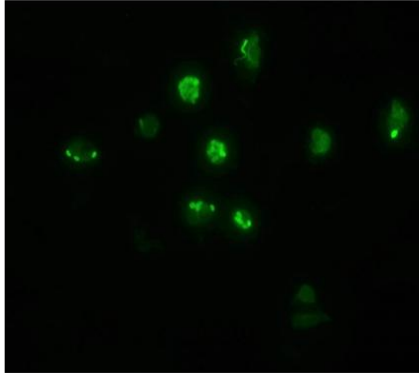
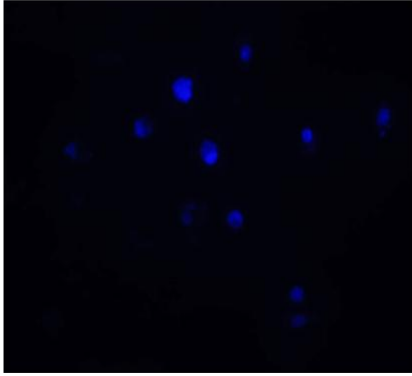
FITC

MERGE

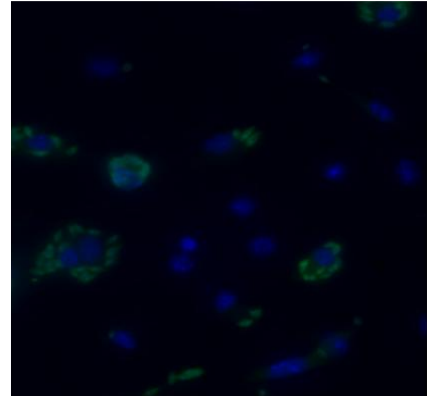
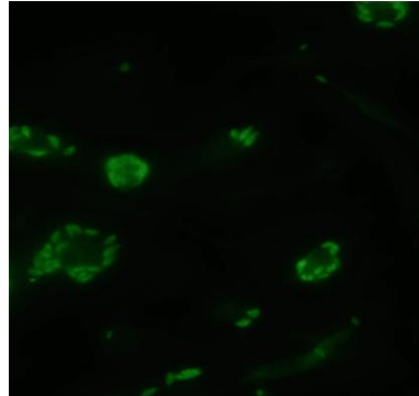
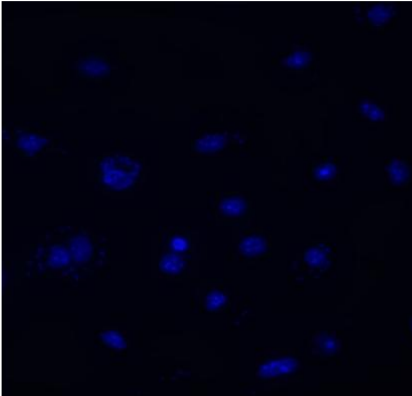
DMSO



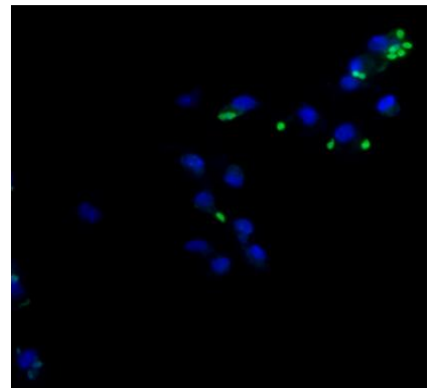
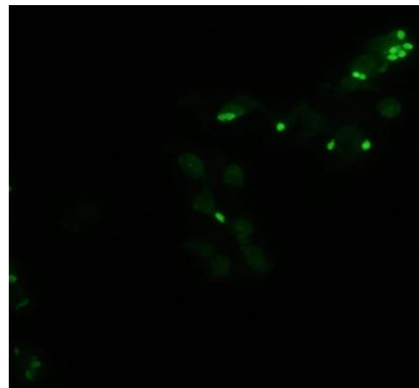
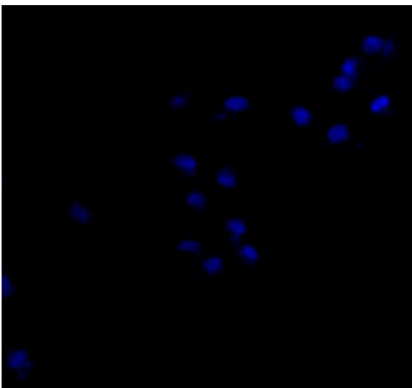
MET



IL-4



LPS + INFY



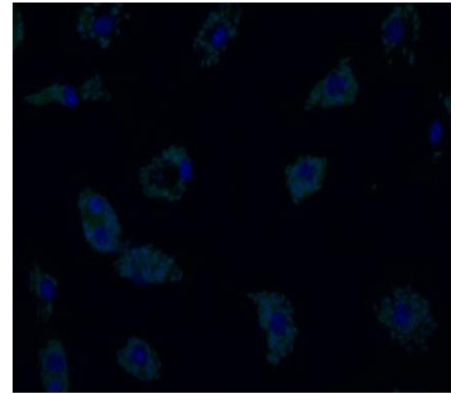
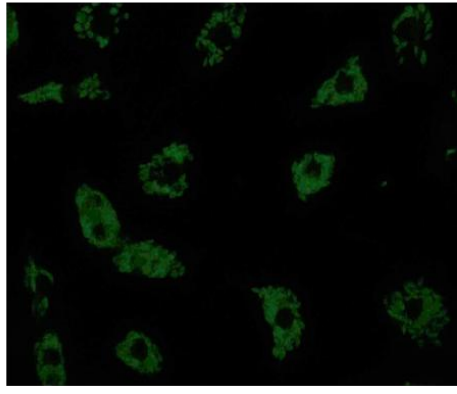
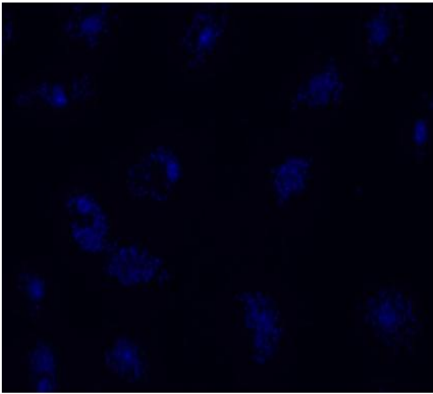
C57BL/6

DAPI

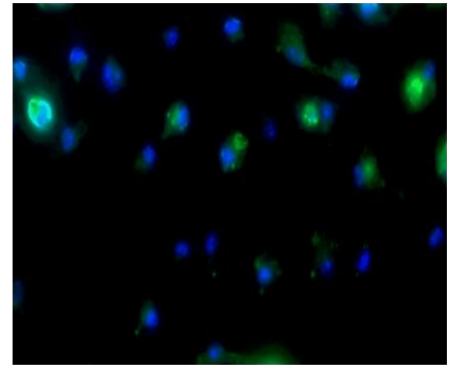
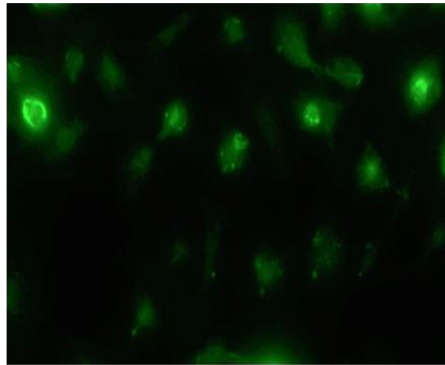
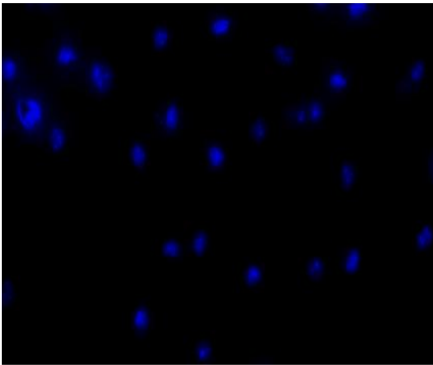
FITC

MERGE

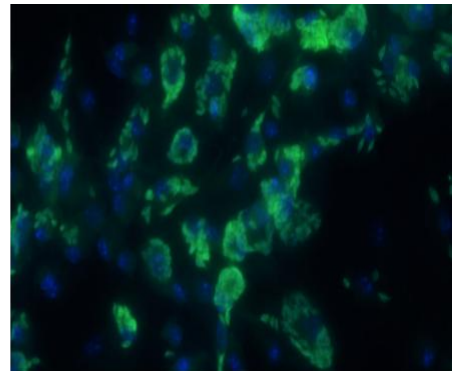
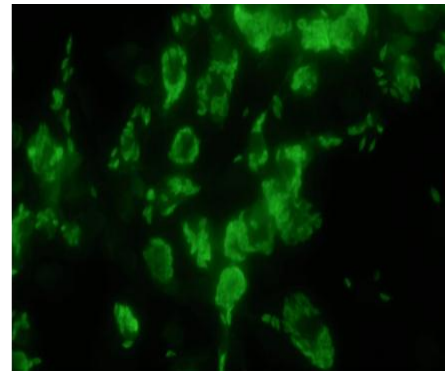
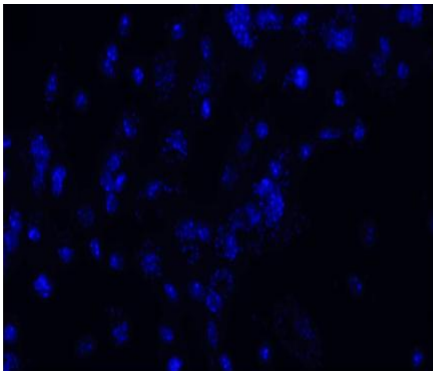
DMSO



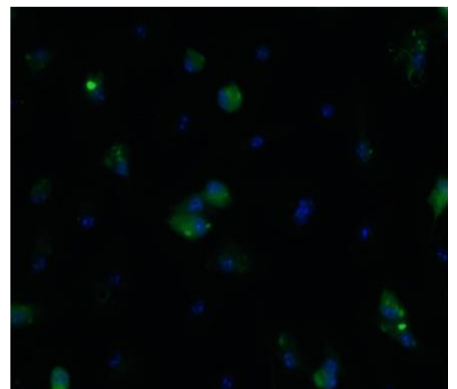
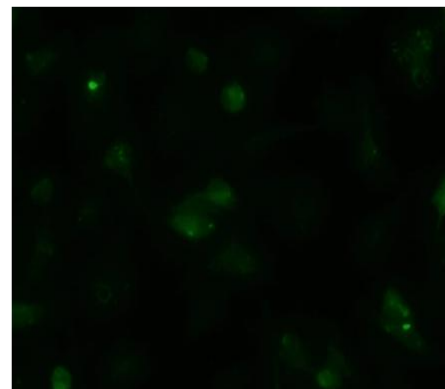
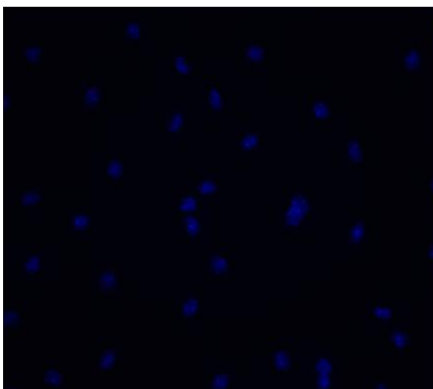
MET



IL-4



LPS + INFY



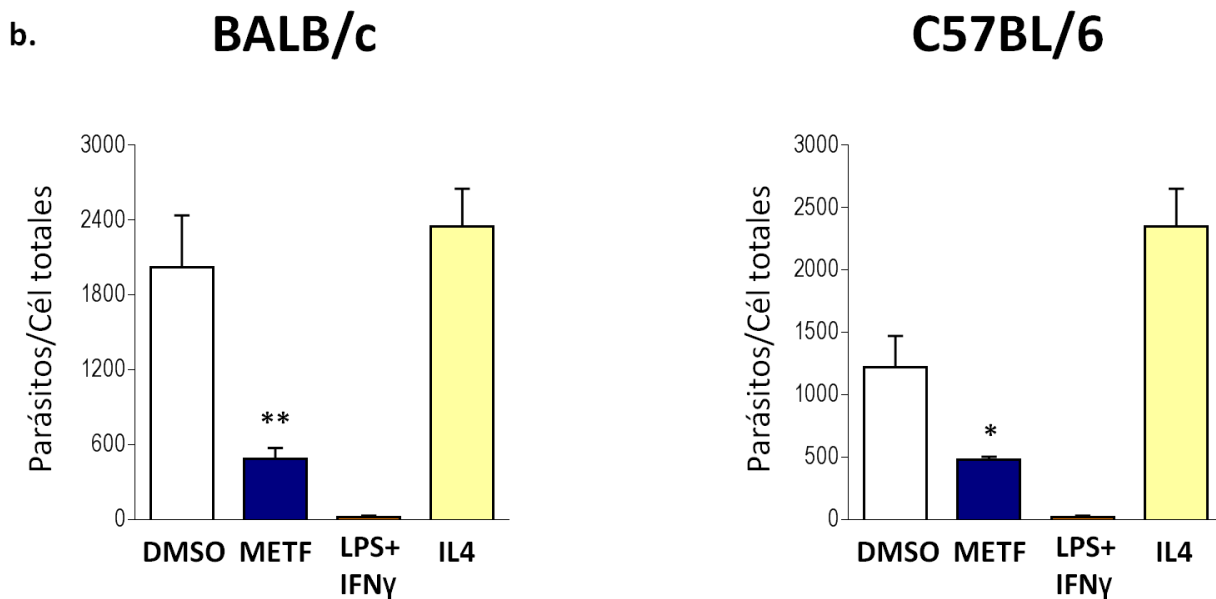


Figura 10 | AMPK y la sobrevivencia del *T. cruzi*. Macrófagos derivados de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6 fueron pretratados con DMSO (como control), o fueron pretratados con metformina (1 mM) durante 4 horas. A continuación todas las condiciones fueron lavadas e infectadas con *T. cruzi* (1:5, células: parásitos) durante 24 h. Además se utilizaron macrófagos sin pretratamiento, estimulados con IL-4 (80 nM) y 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 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)** Una imagen representativa de MDMO pretratados con DMSO, metformina y los controles positivos donde se muestra el núcleo celular teñido con DAPI (azul) y a los amastigotes teñidos con IgG-FITC (verde). **(b)** 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 (* $p < 0.05$ respecto al DMSO; ** $p < 0,005$ respecto al DMSO).

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

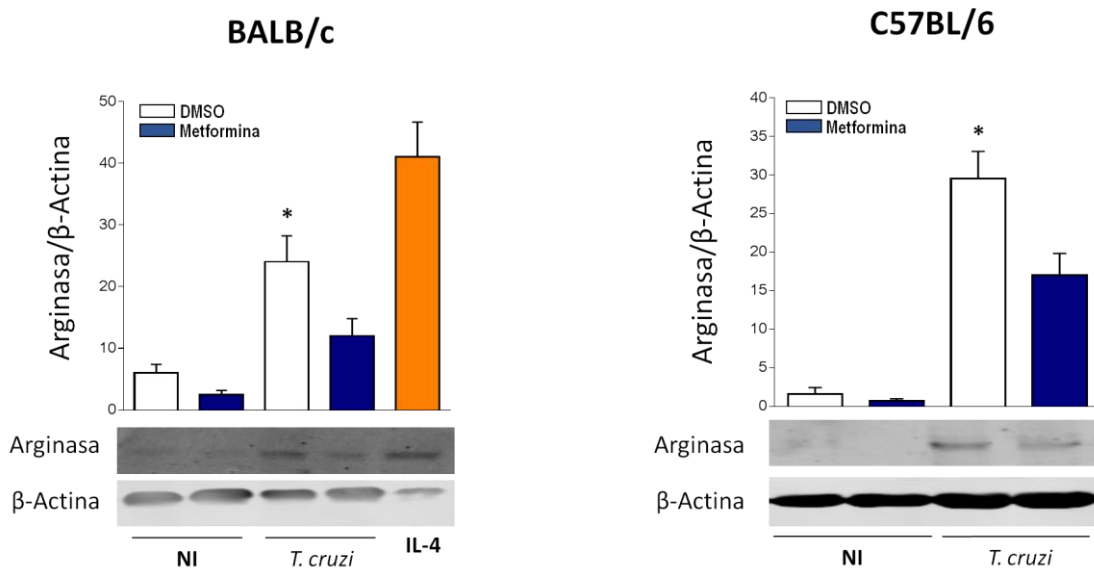
Nuestro siguiente objetivo fue evaluar el efecto de la activación de la AMPK, sobre el balance iNOS/Arginasa que son marcadores de polarización, en macrófagos infectados con el parásito. Utilizando nuestro modelo de activación, macrófagos derivados de médula ósea fueron pretratados con metformina y posteriormente infectados. Como controles positivos macrófagos derivados de médula ósea fueron estimulados con LPS + IFN γ o IL-4.

Como se observa en la Figura 11.a, los macrófagos infectados con *T. cruzi*, elevaron significativamente la expresión 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 metformina e infectados con el parásito, redujeron significativamente la expresión de la enzima arginasa, respecto a los

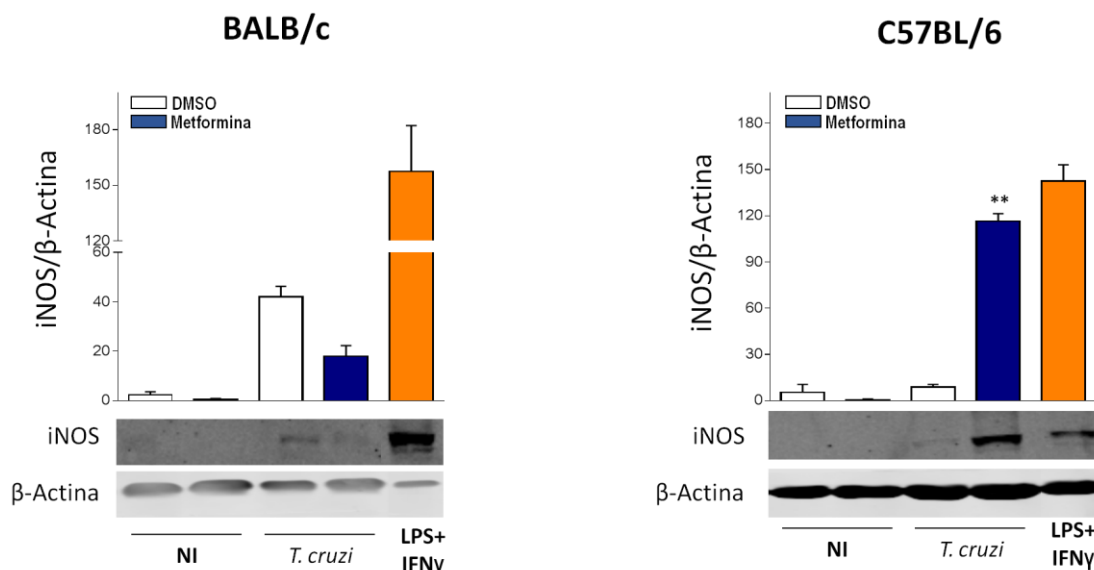
macrófagos infectados, pero sin pretratamiento.

Al analizar la expresión de la enzima iNOS en la Figura 11.b, observamos diferencias entre las dos cepas de ratones. En los C57BL/6 encontramos que al comparar los macrófagos infectados con aquellos infectados pero además pretratados, existe un aumento significativo de la expresión de la enzima cuando éstos fueron incubados con metformina. Por otro lado, los macrófagos provenientes de los ratones BALB/c no presentaron diferencias significativas en la expresión de la enzima entre ninguno de los tratamientos realizados. Además encontramos que los efectos de la activación sobre la enzima iNOS se corresponde con el aumento de la actividad de la misma, ya que como se observa en la Figura 11.c, las concentraciones de ON, obtenidas del análisis de los sobrenadantes de cultivo, fueron significativamente mayores a los niveles observados en aquellos macrófagos procedentes de ratones C57BL/6 infectados pero sin pretratamiento. En contraparte y en correspondencia a lo observado en la figura 10.b los ratones BALB/c no presentaron diferencias significativas en ninguna condición.

a.



b.



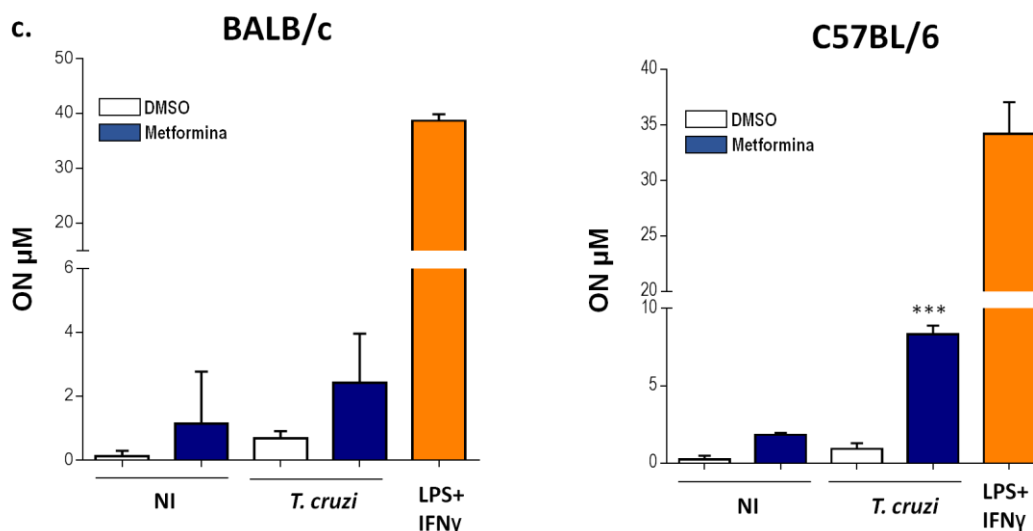


Figura 11 | AMPK y el balance iNOS/Arginasa durante la infección con *T. cruzi*. Macrófagos derivados de medula ósea obtenidos de ratones BALB/c y C57BL/6 fueron pretratados con DMSO (como control), o fueron pretratados con metformina (1 mM) durante 4 horas. A continuación todas las condiciones fueron 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 (b) 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. (c) El ON se determinó mediante la reacción de Griess en sobrenadantes. 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).

AMPK y el perfil de citoquinas

La producción de citoquinas por parte del hospedador como proteínas moduladoras de la respuesta inmune, puede ser alterada por los parásitos, los cuales inducen la producción de citoquinas que en muchos casos favorecen su sobrevivencia.

Las citoquinas IFN γ , IL-12, TNF α e IL-1 β son eficientes para promover la muerte del parásito por parte de los macrófagos activados. Por otra parte, la IL-10 inhibe la acción tripanocida de los macrófagos activados, lo que favorece la reproducción del agente infeccioso.

Se ha observado que la IL-10 inhibe algunos aspectos de la activación de los

macrófagos, lo cual incluye la muerte intracelular de parásitos protozoarios mediada por IFN- γ , de forma tal que en cepas de ratones susceptibles a la infección por *T. cruzi* se ha demostrado protección al administrar un anti IL-10 neutralizante [83].

Para continuar con nuestro estudio, se determinó la producción de las citoquinas IL-12p70, TNF- α , IL-1 β (marcadores de polarización M1) e IL-10 (marcador de polarización M2) (Figura 12). Para ello, macrófagos derivados de médula ósea fueron pretratados con metformina y luego infectados con tripomastigotes de *T. cruzi*. Los sobrenadantes se recolectaron 24 horas pos infección, y luego se procesaron por ELISA. Los resultados de estos experimentos mostraron que aquellos macrófagos pretratados con metformina e infectados con el parásito aumentaron significativamente los niveles de producción de IL-10 en los ratones BALB/c, respecto a los macrófagos infectados, pero sin pretratamiento. En contraparte, los macrófagos que provienen de los ratones C57BL/6 no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Trabajos previos [60] [84] [61] [63], 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 derivados de ratones C57BL/6 infectados con el parásito y pretratados con metformina, los niveles de IL-12p70 aumentaron significativamente así como también se observó un aumento de TNF- α . En los ratones BALB/c observamos que no hay diferencias significativas para las citoquinas IL-12 y TNF- α al comparar las diferentes condiciones a las que fueron sometidos los macrófagos. Sin embargo, encontramos que en los ratones recién mencionados hubo un aumento significativo en los niveles de IL-1 β cuando los macrófagos fueron infectados y se los había tratado con metformina. Pero este último resultado no se encontró en los macrófagos obtenidos de los ratones C57BL/6.

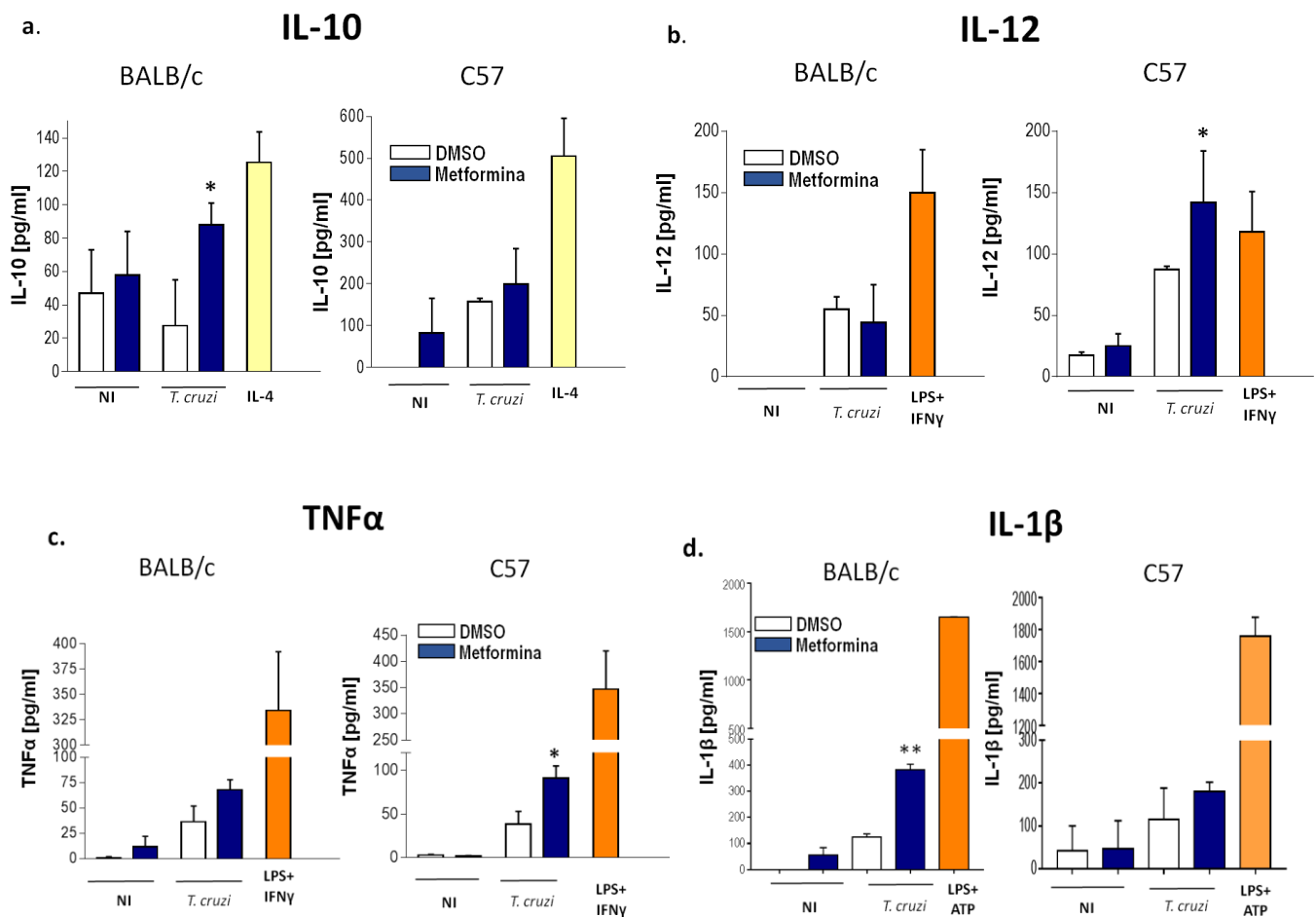


Figura 12 | AMPK y el perfil de citoquinas. Macrófagos derivados de médula ósea obtenidos de ratones BALB/c y C57BL/6 fueron pretratados con DMSO (como control), o fueron pretratados con metformina (1 mM) durante 4 horas. A continuación todas las condiciones fueron lavadas y cultivadas sin infección (NI, no infectados) o infectadas con (*T. cruzi*) 1:5, células: parásitos, durante 24 h. Además, se utilizaron macrófagos derivados de médula ósea sin pretratamiento y sin infección, estimulados con IL-4 (80 nM), con LPS (1 μ g/mL) + IFN γ (100 ng/mL) o con LPS (1 μ g/mL) + ATP (5mM) 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, **(b)** IL-12p70, **(c)** TNF- α e **(d)** IL-1 β a través de ELISA. Las barras representan la media \pm DE correspondiente a 3 experimentos independientes (* p <0.05 respecto al DMSO; ** p <0.005 respecto al DMSO).

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que,

1. La activación de la AMPK se incrementa con metformina en los macrófagos derivados de médula ósea de los ratones C57BL/6 pero no así en los BALB/c.
2. La activación de la vía de AMPK en macrófagos infectados con *T. cruzi* redujo significativamente la carga parasitaria en ambas cepas de ratones, sugiriendo que la activación de la vía es fundamental para la supervivencia y replicación intracelular del parásito.
3. La activación de la vía de AMPK en macrófagos infectados con *T. cruzi* reduce la expresión de las enzimas Arginasa tanto en los ratones C57BL/6 como en los BALB/c mientras que la iNOS sólo aumenta su expresión y actividad en los C57BL/6.
4. El perfil de citoquinas de los macrófagos de las dos cepas de ratones con las cuales trabajamos son diferentes, en los C57BL/6 encontramos un perfil M1 clásico en el cual se produjo un aumento de la producción de IL-12 y TNF- α mientras que los BALB/c posee un perfil "M1-like" caracterizado por la producción de IL-1 β e IL-10.
5. La metformina produce el mismo efecto biológico en ambas clases de ratones pero existe una clara diferencia en los mecanismos por los cuales resuelven la infección.

DISCUSIÓN

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 [62] [84] [60]. 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 [66]. Por otro lado, la polarización de los macrófagos también puede estar influenciada por señales del medioambiente. Uno de los sensores de tales señales es la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), la cual detecta el estado de las reservas de energía celular. La metformina, aumenta la actividad de AMPK y se ha demostrado que el tratamiento con esta droga reduce significativamente la expresión de IL-13 y de marcadores de macrófagos M2, tales como CD206. Por lo tanto, en este trabajo se abordaron aspectos relacionados a la vía de señalización de AMPK y a las funciones efectoras de macrófagos murinos, relevantes tanto para la sobrevivencia del parásito, así como para su eliminación.

En el presente estudio, demostramos que los macrófagos C57BL/6 eran capaces de producir niveles más altos de TNF- α e IL-12 que los macrófagos BALB/c después de la infección, mientras que la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 solo la expresaron significativamente los BALB/c. Por lo tanto, estos resultados junto con los de otros trabajos [85] [86] indican que la respuesta de las citoquinas en los macrófagos C57BL/6 está inclinada hacia un perfil inflamatorio, en comparación con los macrófagos BALB/c. Las diferencias relacionadas con los macrófagos parecen contribuir al desarrollo de la inmunidad adaptativa porque la producción elevada de IL-12 por parte de los macrófagos C57BL/6 favorece la producción de citoquinas Th1 por parte de las células T. La IL-12 se produce principalmente por monocitos/macrófagos durante las fases tempranas de la infección y la inflamación y establece el escenario para la respuesta inmune específica a un determinado antígeno, favoreciendo la diferenciación y la función de las células Th1 mientras inhibe la diferenciación de células Th2 [87]. Por lo tanto, la IL-12 derivada de macrófagos representa un puente funcional entre la inmunidad innata inespecífica temprana y la inmunidad adaptativa posterior. Esto último resalta la importante función de los macrófagos en el desarrollo de las respuestas Th1 y Th2.

Nuestros datos han demostrado que, además de la respuesta producida por citoquinas, existe una diferencia en la respuesta inmune innata de los macrófagos entre los ratones

C57BL/6 y BALB/c. La infección con *T. cruzi* estimuló a los macrófagos C57BL/6, pero no a los macrófagos BALB/c, para liberar ON, molécula efectora para la eliminación de parásitos. Sin embargo, al aplicar el tratamiento con metformina se observó que ambas cepas son capaces de disminuir la carga parasitaria. Los macrófagos de los ratones C57BL/6 eliminan al parásito mediante los mecanismos clásicos que son característicos del perfil M1, pero los BALB/c no expresan este fenotipo aunque comparten algunas características, como la disminución de la expresión de la enzima arginasa. Cuando observamos el perfil de citoquinas entre ambas cepas de ratón estos son diferentes, los ratones BALB/c a diferencia de los C57BL/6 producen gran cantidad de IL-1 β y esta podría ser la clave para entender como estos ratones son capaces de destruir al parásito.

Investigaciones previas, 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 especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales son capaces de eliminar a los parásitos [88] [89]. Los resultados obtenidos en un trabajo previo del grupo [57], 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 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. Este 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 inflammasoma NLRP3 junto con la producción de ROS mitocondriales. 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 [90]. Estos estudios mostraron además que la producción de ON es abolida en macrófagos primarios, provenientes de ratones infectados con *T. cruzi* (cepa Y) deficientes para NLRP3. Sin embargo, aunque algunos autores [84], argumentan que dicho fenómeno es dependiente tanto de la IL-1 β y del IL-1R, otros autores postulan que la activación del NLRP3 no depende de estas moléculas [91]. 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* [92] [93]. En nuestros estudios previos, el efecto de la rapamicina sobre macrófagos derivados de médula ósea infectados con el parásito, indujo la activación del receptor NLRP3, producción de IL-1 β y mtROS (como segundo mensajero) de acuerdo a [92] [94] [95] 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 [96] [88]. 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 [91]. También 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* [75].

Otro trabajo ha demostrado que los macrófagos pueden tener otro fenotipo diferente. Ellos estudiaron la vía Wnt / β -catenina y observaron que si bien la activación de la vía no promovió la replicación del parásito intracelular, los tratamientos de macrófagos con inhibidores específicos de la actividad transcripcional de β -catenina o la inhibición de la secreción de proteínas Wnt pudieron inhibir la replicación del parásito mediante la modificación de la actividad de los macrófagos [97]. La inhibición de la vía de señalización de Wnt aumentó la producción de las citocinas proinflamatorias IFN- γ , IL-12, TNF- α e IL-6 y suprimió la producción de TGF- β , resultados que están de acuerdo con informes anteriores que muestran que la activación de la vía canónica en macrófagos y células dendríticas controla la respuesta inflamatoria [98]. Además, estos tratamientos indujeron

la disminución de la actividad de la arginasa pero no logró regular la actividad de iNOS, lo que sugiere que los macrófagos tratados no encajan completamente en el fenotipo de macrófagos inflamatorios (M1) activados de manera clásica. Curiosamente, y a pesar de que existe una relación estrecha entre la activación de la vía Wnt / β -catenina y la inducción de IDO y viceversa [99] [100] [101], en ese modelo experimental, la inhibición de la β -catenina aumento la expresión y actividad de IDO. Además, la actividad IDO demostró ser crítica para el control de la replicación de *T. cruzi* en macrófagos derivados de médula ósea ya que la expresión del gen IDO es inducida no sólo en condiciones tolerogénicas sino también por IFN- γ y TNF- α durante condiciones inflamatorias [102] [103]. Así, los resultados que obtuvieron sugieren que la actividad anti-*T. cruzi* de los macrófagos tratados con inhibidores se debe a la producción de moléculas antimicrobianas inducibles por citocinas proinflamatorias, siendo la enzima IDO una de las más importantes. Por lo tanto, el mecanismo por el cual los macrófagos BALB/c tratados con metformina reducen la sobrevivencia del *T. cruzi* no es el convencional y según lo comentado anteriormente, son varias las vías que puede utilizar para eliminarlo. En consecuencia, tendremos que seguir profundizando y estudiando las diferentes alternativas para poder comprender mejor el efecto de la metformina sobre los macrófagos BALB/c frente a la infección. Nuestros resultados indicarían que estamos en presencia de un perfil de activación "M1-like", como ocurre en los trabajos anteriormente citados [57] [97].

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 también resaltan la necesidad de comprender las diferencias funcionales de la inmunidad innata con respecto al background genético y la utilidad que se desprende de este conocimiento para el planteamiento de nuevas estrategias terapéuticas.

En este contexto, podemos decir que la infección por *T. cruzi* activa una gran cantidad de vías de señalización que finalmente regulan a los mediadores inmunitarios para determinar la modulación de un conjunto definido de funciones efectoras en macrófagos y, por lo tanto, establece un marco conceptual para el desarrollo de terapias novedosas. Los patógenos han evolucionado y utilizan múltiples mecanismos para manipular las vías reguladoras del huésped y usan el metabolismo de la célula huésped para su propio beneficio. La modulación de la actividad de AMPK parece ser un proceso fundamental involucrado en la interacción patógeno-hospedador. Aunque la activación de AMPK ayuda a los patógenos a obtener cantidades suficientes de energía y nutrientes para su replicación, la inhibición de AMPK también es una estrategia utilizada por los patógenos

para evadir la defensa innata del hospedador. Determinar cómo los patógenos intracelulares manipulan las funciones metabólicas del hospedador para favorecer su propio crecimiento y supervivencia es esencial para identificar los mecanismos de patogenicidad y adaptación. El bloqueo o la activación de vías metabólicas específicas pueden mejorar la respuesta de las células hospedadoras de los patógenos intracelulares y podría usarse en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Las oportunidades surgen del uso de agonistas/antagonistas farmacológicos de AMPK, como por ejemplo la metformina, y podrían allanar el camino hacia el diseño de nuevas terapias. Por lo tanto, un desafío futuro importante será seguir analizando el papel preciso que desempeña la AMPK en el ciclo de vida de los parásitos como así también de virus y bacterias, lo que permitirá una mejor justificación para identificar nuevos objetivos y diseñar nuevas intervenciones clínicas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] «La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)», *World Health Organization*. [En línea]. Disponible en: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). [Accedido: 06-oct-2018].
- [2] A. M. Jansen, S. C. das C. Xavier, y A. L. R. Roque, «Trypanosoma cruzi transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil», *Parasit. Vectors*, vol. 11, n.º 1, p. 502, sep. 2018.
- [3] C. Mitchell y <https://www.facebook.com/pahowho>, «OPS/OMS | Enfermedad de Chagas en las Américas para los trabajadores de salud pública; 2017», *Pan American Health Organization / World Health Organization*, 10-ago-2017. [En línea]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13568:chagas-in-the-americas-for-public-health-workers-2017&Itemid=40721&lang=es. [Accedido: 06-oct-2018].
- [4] Z. M. Cucunubá, O. Okuwoga, M.-G. Basáñez, y P. Nouvellet, «Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis», *Parasit. Vectors*, vol. 9, p. 42, ene. 2016.
- [5] F. R. Martins-Melo, A. N. Ramos, C. H. Alencar, W. Lange, y J. Heukelbach, «Mortality of Chagas' disease in Brazil: spatial patterns and definition of high-risk areas», *Trop. Med. Int. Health TM IH*, vol. 17, n.º 9, pp. 1066-1075, sep. 2012.
- [6] J. C. F. Rodrigues, J. L. P. Godinho, y W. de Souza, «Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure», *Subcell. Biochem.*, vol. 74, pp. 1-42, 2014.
- [7] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, y C. A. Janeway, «A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity», *Nature*, vol. 388, n.º 6640, pp. 394-397, jul. 1997.
- [8] J. A. Hoffmann, F. C. Kafatos, C. A. Janeway, y R. A. Ezekowitz, «Phylogenetic perspectives in innate immunity», *Science*, vol. 284, n.º 5418, pp. 1313-1318, may 1999.
- [9] S. Gallucci y P. Matzinger, «Danger signals: SOS to the immune system», *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 13, n.º 1, pp. 114-119, feb. 2001.
- [10] R. Medzhitov y C. A. Janeway, «Innate immune recognition and control of adaptive immune responses», *Semin. Immunol.*, vol. 10, n.º 5, pp. 351-353, oct. 1998.
- [11] R. Medzhitov, «Recognition of microorganisms and activation of the immune response», *Nature*, vol. 449, n.º 7164, pp. 819-826, oct. 2007.
- [12] H. Ait-Oufella, A. P. Sage, Z. Mallat, y A. Tedgui, «Adaptive (T and B cells) immunity and control by dendritic cells in atherosclerosis.», *Circ. Res.*, vol. 114, n.º 10, pp. 1640-1660, 2014.
- [13] P. Italiani y D. Boraschi, «From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation», *Front. Immunol.*, vol. 5, p. 514, 2014.
- [14] S. J. Jenkins y D. A. Hume, «Homeostasis in the mononuclear phagocyte system», *Trends Immunol.*, vol. 35, n.º 8, pp. 358-367, ago. 2014.
- [15] Y. Okabe y R. Medzhitov, «Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages», *Cell*, vol. 157, n.º 4, pp. 832-844, may 2014.
- [16] R. D. Stout y J. Suttles, «Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments», *J. Leukoc. Biol.*, vol. 76, n.º 3, pp. 509-513, sep. 2004.
- [17] S. S. Bohlson, S. D. O'Conner, H. J. Hulsebus, M.-M. Ho, y D. A. Fraser,

«Complement, C1q, and C1q-Related Molecules Regulate Macrophage Polarization», *Front. Immunol.*, vol. 5, ago. 2014.

- [18] D. M. Mosser y J. P. Edwards, «Exploring the full spectrum of macrophage activation», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, n.º 12, pp. 958-969, dic. 2008.
- [19] F. O. Martinez, L. Helming, y S. Gordon, «Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective», *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, pp. 451-483, 2009.
- [20] C. Stempin, L. Giordanengo, S. Gea, y F. Cerbán, «Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen», *J. Leukoc. Biol.*, vol. 72, n.º 4, pp. 727-734, oct. 2002.
- [21] C. C. Stempin, L. R. Dulgerian, V. V. Garrido, y F. M. Cerban, «Arginase in parasitic infections: macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals», *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2010, p. 683485, 2010.
- [22] C. C. Stempin y F. M. Cerban, «MACROFAGOS E INDUCCION DE ARGINASA COMO MECANISMO DE EVASION DE PARASITOS», p. 10, 2007.
- [23] C. D. Mills, «Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages», *Front. Immunol.*, vol. 6, p. 212, 2015.
- [24] S. Zhang, C. C. Kim, S. Batra, J. H. McKerrow, y P. Loke, «Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines», *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 4, n.º 3, p. e648, mar. 2010.
- [25] S. Gordon, «Alternative activation of macrophages», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, n.º 1, pp. 23-35, ene. 2003.
- [26] A. Sica y A. Mantovani, «Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas», *J. Clin. Invest.*, vol. 122, n.º 3, pp. 787-795, mar. 2012.
- [27] M. L. Novak y T. J. Koh, «Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair», *Am. J. Pathol.*, vol. 183, n.º 5, pp. 1352-1363, nov. 2013.
- [28] E. R. Pfefferkorn, «Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 81, n.º 3, pp. 908-912, feb. 1984.
- [29] C. P. Knubel *et al.*, «Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi*», *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 24, n.º 8, pp. 2689-2701, ago. 2010.
- [30] N. Dey *et al.*, «Caspase-1/ASC inflammasome-mediated activation of IL-1 β -ROS-NF- κ B pathway for control of *Trypanosoma cruzi* replication and survival is dispensable in NLRP3-/- macrophages», *PloS One*, vol. 9, n.º 11, p. e111539, 2014.
- [31] G. K. Silva *et al.*, «Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 184, n.º 3, pp. 1148-1152, feb. 2010.
- [32] G. I. Byrne, L. K. Lehmann, J. G. Kirschbaum, E. C. Borden, C. M. Lee, y R. R. Brown, «Induction of tryptophan degradation in vitro and in vivo: a gamma-interferon-stimulated activity», *J. Interferon Res.*, vol. 6, n.º 4, pp. 389-396, ago. 1986.
- [33] S. Accarias, G. Lugo-Villarino, G. Foucras, O. Neyrolles, S. Boullier, y G. Tabouret, «Pyroptosis of resident macrophages differentially orchestrates inflammatory responses to *Staphylococcus aureus* in resistant and susceptible mice», *Eur. J. Immunol.*, vol. 45, n.º 3, pp. 794-806, mar. 2015.
- [34] F. Martinon, K. Burns, y J. Tschopp, «The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta», *Mol. Cell*, vol. 10, n.º 2, pp. 417-426, ago. 2002.
- [35] M. Tibayrenc *et al.*, «Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage.», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, n.º 12, pp. 5129-5133, jun. 1991.
- [36] R. A. Mortara, «*Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with

different structures on the surface of HeLa cells», *Exp. Parasitol.*, vol. 73, n.º 1, pp. 1-14, jul. 1991.

- [37] B. A. Burleigh y N. W. Andrews, «The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells», *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 49, pp. 175-200, 1995.
- [38] «*Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor», *J. Exp. Med.*, vol. 182, n.º 5, pp. 1243-1258, nov. 1995.
- [39] C. D. Davis y R. E. Kuhn, «Selective binding of *Trypanosoma cruzi* to host cell membrane polypeptides.», *Infect. Immun.*, vol. 58, n.º 1, pp. 1-6, ene. 1990.
- [40] I. A. Clark y K. A. Rockett, «Nitric oxide and parasitic disease», *Adv. Parasitol.*, vol. 37, pp. 1-56, 1996.
- [41] J. Savill, «Apoptosis in resolution of inflammation», *J. Leukoc. Biol.*, vol. 61, n.º 4, pp. 375-380, abr. 1997.
- [42] L. R. Dulgerian, V. V. Garrido, C. C. Stempin, y F. M. Cerbán, «Programmed death ligand 2 regulates arginase induction and modifies *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages during murine experimental infection», *Immunology*, vol. 133, n.º 1, pp. 29-40, may 2011.
- [43] J. Mössner, R. Hammermann, y K. Racké, «Concomitant down-regulation of L-arginine transport and nitric oxide (NO) synthesis in rat alveolar macrophages by the polyamine spermine», *Pulm. Pharmacol. Ther.*, vol. 14, n.º 4, pp. 297-305, 2001.
- [44] S.-J. Lee *et al.*, «Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation», *Mol. Cells*, vol. 16, n.º 1, pp. 97-105, ago. 2003.
- [45] S. El-Gayar, H. Thüring-Nahler, J. Pfeilschifter, M. Röllinghoff, y C. Bogdan, «Translational control of inducible nitric oxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 171, n.º 9, pp. 4561-4568, nov. 2003.
- [46] M. Mori, «Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling», *J. Nutr.*, vol. 137, n.º 6 Suppl 2, pp. 1616S-1620S, 2007.
- [47] G. Wu y S. M. Morris, «Arginine metabolism: nitric oxide and beyond», *Biochem. J.*, vol. 336 (Pt 1), pp. 1-17, nov. 1998.
- [48] 737, «Arginasa, un enzima clave en el destino de la respuesta inmune». [En línea]. Disponible en: <https://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/rincon-profesor-ciencias/articulos-divulgacion-cientifica/352-arginasa-un-enzima-clave-en-el-destino-de-la-respuesta-inmune>. [Accedido: 03-nov-2018].
- [49] C. S. Park *et al.*, «Metformin reduces airway inflammation and remodeling via activation of AMP-activated protein kinase», *Biochem. Pharmacol.*, vol. 84, n.º 12, pp. 1660-1670, dic. 2012.
- [50] L. Ding *et al.*, «Metformin prevents cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of tumor associated macrophages», *Oncotarget*, vol. 6, n.º 34, pp. 36441-36455, oct. 2015.
- [51] R. J O Dowling, P. J Goodwin, y V. Stambolic, *Dowling RJ, Goodwin PJ, Stambolic V Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. BMC Med* 9: 33, vol. 9. 2011.
- [52] A. Decensi *et al.*, «Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis», *Cancer Prev. Res. Phila. Pa*, vol. 3, n.º 11, pp. 1451-1461, nov. 2010.
- [53] O. Arrieta *et al.*, «Metformin use and its effect on survival in diabetic patients with advanced non-small cell lung cancer», *BMC Cancer*, vol. 16, ago. 2016.
- [54] K. Hosono *et al.*, «Metformin Suppresses Colorectal Aberrant Crypt Foci in a Short-term Clinical Trial», *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)*, pp. 1940-6207.CAPR-10-0186, sep. 2010.
- [55] «Gene signature of metformin actions on primary breast cancer within a window of

opportunity randomized clinical trial.: *Journal of Clinical Oncology*: Vol 28, No 15_suppl». [En línea]. Disponible en: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2010.28.15_suppl.560. [Accedido: 22-oct-2018].

- [56] R. J. O. Dowling, M. Zakikhani, I. G. Fantus, M. Pollak, y N. Sonenberg, «Metformin Inhibits Mammalian Target of Rapamycin–Dependent Translation Initiation in Breast Cancer Cells», *Cancer Res.*, vol. 67, n.º 22, pp. 10804-10812, nov. 2007.
- [57] J. D. Rojas Márquez, Y. Ana, R. E. Baigorri, C. C. Stempin, y F. M. Cerban, «Mammalian Target of Rapamycin Inhibition in Trypanosoma cruzi-Infected Macrophages Leads to an Intracellular Profile That Is Detrimental for Infection», *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 313, 2018.
- [58] J. E. Duque, C. López, y N. Cruz, «Antitumor mechanisms of metformin: Signaling, metabolism, immunity and beyond», *Univ. Sci.*, vol. 15, n.º 2, pp. 122-129, may 2010.
- [59] D. G. Capelluto, U. Hellman, J. J. Cazzulo, y J. J. Cannata, «Purification and some properties of serine hydroxymethyltransferase from Trypanosoma cruzi», *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, n.º 3, pp. 712-719, feb. 2000.
- [60] C. Stempin, L. Giordanengo, S. Gea, y F. Cerbán, «Alternative activation and increase of Trypanosoma cruzi survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen», *J. Leukoc. Biol.*, vol. 72, n.º 4, pp. 727-734, oct. 2002.
- [61] C. C. Stempin, T. B. Tanos, O. A. Coso, y F. M. Cerbán, «Arginase induction promotes Trypanosoma cruzi intracellular replication in Cruzipain-treated J774 cells through the activation of multiple signaling pathways», *Eur. J. Immunol.*, vol. 34, n.º 1, pp. 200-209, ene. 2004.
- [62] C. C. Stempin, V. V. Garrido, L. R. Dulgerian, y F. M. Cerbán, «Cruzipain and SP600125 induce p38 activation, alter NO/arginase balance and favor the survival of Trypanosoma cruzi in macrophages», *Acta Trop.*, vol. 106, n.º 2, pp. 119-127, may 2008.
- [63] C. C. Stempin y F. M. Cerban, «[Macrophages and arginase induction as a mechanism for parasite escape]», *Medicina (Mex.)*, vol. 67, n.º 6 Pt 2, pp. 737-746, 2007.
- [64] V. V. Garrido, L. R. Dulgerian, C. C. Stempin, y F. M. Cerbán, «The increase in mannose receptor recycling favors arginase induction and Trypanosoma cruzi survival in macrophages», *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 7, n.º 9, pp. 1257-1272, 2011.
- [65] W. Noël, G. Raes, G. Hassanzadeh Ghassabeh, P. De Baetselier, y A. Beschin, «Alternatively activated macrophages during parasite infections», *Trends Parasitol.*, vol. 20, n.º 3, pp. 126-133, mar. 2004.
- [66] P. Vincendeau, A. P. Gobert, S. Daulouède, D. Moynet, y M. D. Mossalayi, «Arginases in parasitic diseases», *Trends Parasitol.*, vol. 19, n.º 1, pp. 9-12, ene. 2003.
- [67] Y.-C. Liu, X.-B. Zou, Y.-F. Chai, y Y.-M. Yao, «Macrophage polarization in inflammatory diseases», *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 10, n.º 5, pp. 520-529, 2014.
- [68] L. Lefèvre *et al.*, «The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to Leishmania infantum», *Immunity*, vol. 38, n.º 5, pp. 1038-1049, may 2013.
- [69] G. D. Muylder *et al.*, «A Trypanosoma brucei Kinesin Heavy Chain Promotes Parasite Growth by Triggering Host Arginase Activity», *PLOS Pathog.*, vol. 9, n.º 10, p. e1003731, oct. 2013.
- [70] «Progressive Visceral Leishmaniasis Is Driven by Dominant Parasite-induced STAT6 Activation and STAT6-dependent Host Arginase 1 Expression». [En línea]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002417>. [Accedido: 22-oct-2018].
- [71] C. C. Stempin, C. C. Motrán, M. P. Aoki, C. R. Falcón, F. M. Cerbán, y L. Cervi, «PD-L2 negatively regulates Th1-mediated immunopathology during Fasciola hepatica

- infection», *Oncotarget*, vol. 7, n.º 47, pp. 77721-77731, oct. 2016.
- [72] P. J. Murray y T. A. Wynn, «Protective and pathogenic functions of macrophage subsets», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, n.º 11, pp. 723-737, oct. 2011.
- [73] P. J. Murray y T. A. Wynn, «Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization», *J. Leukoc. Biol.*, vol. 89, n.º 4, pp. 557-563, abr. 2011.
- [74] C. Shi y E. G. Pamer, «Monocyte recruitment during infection and inflammation», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, n.º 11, pp. 762-774, oct. 2011.
- [75] A. Singhal *et al.*, «Metformin as adjunct antituberculosis therapy», *Sci. Transl. Med.*, vol. 6, n.º 263, p. 263ra159, nov. 2014.
- [76] «Resveratrol Reverses Functional Chagas Heart Disease in Mice». [En línea]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1005947>. [Accedido: 22-oct-2018].
- [77] «Sistema Nacional de Bioterios - República Argentina». [En línea]. Disponible en: <http://www.bioterios.mincyt.gob.ar/>. [Accedido: 22-oct-2018].
- [78] C. C. Stempin, J. D. R. Marquez, Y. Ana, y F. M. Cerban, «GRAIL and Otubain-1 are Related to T Cell Hyporesponsiveness during Trypanosoma cruzi Infection», *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 11, n.º 1, p. e0005307, ene. 2017.
- [79] X. Zhang, R. Goncalves, y D. M. Mosser, «The Isolation and Characterization of Murine Macrophages», *Curr. Protoc. Immunol. Ed. John E Coligan AI*, vol. CHAPTER, p. Unit-14.1, nov. 2008.
- [80] J. Weischenfeldt y B. Porse, «Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications», *CSH Protoc.*, vol. 2008, p. pdb.prot5080, dic. 2008.
- [81] M. M. Bradford, «A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding», *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248-254, may 1976.
- [82] L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, y S. R. Tannenbaum, «Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids», *Anal. Biochem.*, vol. 126, n.º 1, pp. 131-138, oct. 1982.
- [83] I. A. Abrahamsohn y R. L. Coffman, «Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection», *Exp. Parasitol.*, vol. 84, n.º 2, pp. 231-244, nov. 1996.
- [84] C. C. Stempin, L. R. Dulgerian, V. V. Garrido, y F. M. Cerban, «Arginase in parasitic infections: macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals», *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2010, p. 683485, 2010.
- [85] E. Kuroda, T. Kito, y U. Yamashita, «Reduced expression of STAT4 and IFN-gamma in macrophages from BALB/c mice», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 168, n.º 11, pp. 5477-5482, jun. 2002.
- [86] «Mechanisms of Enhanced Macrophage-Mediated Prostaglandin E2 Production and Its Suppressive Role in Th1 Activation in Th2-Dominant BALB/c Mice | The Journal of Immunology». [En línea]. Disponible en: <http://www.jimmunol.org/content/170/2/757>. [Accedido: 30-oct-2018].
- [87] G. Trinchieri, «Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity», *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, n.º 2, pp. 133-146, feb. 2003.
- [88] Y. S. Hwang *et al.*, «Interleukin-1beta stimulates IL-8 expression through MAP kinase and ROS signaling in human gastric carcinoma cells», *Oncogene*, vol. 23, n.º 39, pp. 6603-6611, ago. 2004.
- [89] Y. Y. Lo, J. A. Conquer, S. Grinstein, y T. F. Cruz, «Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species», *J. Cell. Biochem.*, vol. 69, n.º 1, pp. 19-29, abr. 1998.
- [90] «Caspase-1/ASC Inflammasome-Mediated Activation of IL-1 β -ROS-NF- κ B Pathway for Control of Trypanosoma cruzi Replication and Survival Is Dispensable in

NLRP3^{-/-} Macrophages». [En línea]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0111539>. [Accedido: 30-oct-2018].

- [91] V. M. Gonçalves *et al.*, «NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production», *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 7, n.º 10, p. e2469, 2013.
- [92] R. Zhou, A. S. Yazdi, P. Menu, y J. Tschopp, «A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation», *Nature*, vol. 469, n.º 7329, pp. 221-225, ene. 2011.
- [93] N. J. Garg, «Inflammasomes in cardiovascular diseases», *Am. J. Cardiovasc. Dis.*, vol. 1, n.º 3, pp. 244-254, 2011.
- [94] F. Martinon, «Signaling by ROS drives inflammasome activation», *Eur. J. Immunol.*, vol. 40, n.º 3, pp. 616-619, mar. 2010.
- [95] M. T. Sorbara y S. E. Girardin, «Mitochondrial ROS fuel the inflammasome», *Cell Res.*, vol. 21, n.º 4, pp. 558-560, abr. 2011.
- [96] F. Bauernfeind, E. Bartok, A. Rieger, L. Franchi, G. Núñez, y V. Hornung, «Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome», *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 187, n.º 2, pp. 613-617, jul. 2011.
- [97] X. Volpini *et al.*, «*Trypanosoma cruzi* Exploits Wnt Signaling Pathway to Promote Its Intracellular Replication in Macrophages», *Front. Immunol.*, vol. 9, abr. 2018.
- [98] S. Manicassamy *et al.*, «Activation of β -Catenin in Dendritic Cells Regulates Immunity Versus Tolerance in the Intestine», *Science*, vol. 329, n.º 5993, pp. 849-853, ago. 2010.
- [99] A. Holtzhausen *et al.*, «Melanoma-Derived Wnt5a Promotes Local Dendritic-Cell Expression of IDO and Immunotolerance: Opportunities for Pharmacologic Enhancement of Immunotherapy», *Cancer Immunol. Res.*, vol. 3, n.º 9, p. 1082, sep. 2015.
- [100] von B.-B. M. al et, «CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mec... - PubMed - NCBI». [En línea]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16522817>. [Accedido: 30-oct-2018].
- [101] «Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. - PubMed - NCBI». [En línea]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7514170>. [Accedido: 30-oct-2018].
- [102] C. M. ROBINSON, P. T. HALE, y J. M. CARLIN, «The Role of IFN- γ and TNF- α -Responsive Regulatory Elements in the Synergistic Induction of Indoleamine Dioxygenase», *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.*, vol. 25, n.º 1, pp. 20-30, ene. 2005.
- [103] H. H. Hassanain, S. Y. Chon, y S. L. Gupta, «Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor», *J. Biol. Chem.*, vol. 268, n.º 7, pp. 5077-5084, mar. 1993.