

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Clínica Médica  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical

**ANDRÉIA BARROSO GONÇALVES**

**PAPEL DO RECEPTOR ARIL HIDROCARBONO (AHR) DURANTE A  
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR  
*Trypanosoma cruzi***

**BELO HORIZONTE – MG**

**2014**

**ANDRÉIA BARROSO GONÇALVES**

**PAPEL DO RECEPTOR ARIL HIDROCARBONO (AHR) DURANTE A  
INFECCÃO EXPERIMENTAL POR  
*Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical do departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fabiana Simão Machado  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vanessa Pinho da Silva

**BELO HORIZONTE - MG**

**2014**

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

## **REITOR**

Prof. Jaime Arturo Ramirez

## **VICE-REITORA**

Prof<sup>ª</sup>. Sandra Regina Goulart Almeida

## **PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

## **PRÓ-REITOR DE PESQUISA**

Prof<sup>ª</sup>. Adelina Martha dos Reis

## **DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA**

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

## **VICE-DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA**

Prof. Humberto José Alves

## **COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

## **SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof<sup>ª</sup>. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

## **CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

Prof. Ricardo de Menezes Macedo

## **COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

## **SUB-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.

## **COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Denise Utsh Gonçalves

Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior

Paula Souza Lage Carvalho (Representante Discente)

*“Que a sabedoria e a paciência sejam sempre os principais instrumentos a nos levar, a compreensão e aceitação, de que temos o nosso próprio tempo. ”*

Andréia Barroso Gonçalves

*“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar. ”*

Paulo Freire

*“Our schools have a doubly hard task, not just improving reading, writing and arithmetic but entrepreneurship, innovation and creativity.”*

Ken Robinson

*À minha mãe, Kátia Barroso Gonçalves, que a tantos  
ajudou nos percalços científicos, e que agora tem a  
recompensa por boa parte de tudo aquilo que renunciou  
em prol da minha educação. Com amor e gratidão.*

*“E eu vou chegar  
Pedir e agradecer  
Pois a vitória de um homem  
As vezes se esconde  
Num gesto forte  
Que só ele pode ver...”  
O Rappa “Lado B Lado A”*

*Ao meu irmão Alex: eis aqui mais uma  
felicidade a ser compartilhada. Nós podemos ver!*

*Ao meu pai que com certeza deve estar, em  
algum lugar, com a energia em vibração por mais  
uma conquista daquela pequena menina que gostava  
tanto de acompanhá-lo.*

*Aos meus familiares e amigos que  
pacientemente compreenderam minha ausência em  
vários momentos.*

*À energia maior que me guia, sustenta,  
ampara e me ajudou a chegar até aqui.*

# AGRADECIMENTOS

*“O homem, ser de relações, e não só de contatos, não apenas está no mundo, mas com o mundo.”*

Paulo Freire

À Prof<sup>a</sup>. Fabiana Simão Machado que após certo período de insistência aceitou meu pedido de orientação. Desde a iniciação científica tive paciência e fé de acreditar que aquele laboratório que conheci, literalmente aos tijolos, seria meu berço científico. Da parte dela houve a crença de que eu era uma pessoa com potencial. Desde então, ao longo destes cinco anos, nunca deixou de estimular e acreditar em mim. Pacientemente acreditou no meu potencial até mesmo em momentos em que nem eu acreditava mais. Sou grata por ter permitido a minha entrada e por ter feito de tudo para que eu permanecesse no que hoje é o seu, e com sua licença, o nosso Laboratório de Imunorregulação de Doenças Infecciosas (LIDIN)

Aos colegas dos primórdios do LIDIN, Ronan Araújo, Lísia Éssper e Fátima Brant. Hoje podemos rir de como era procurar um reagente, equipamento, material em cada laboratório para fazermos um simples RPMI. Felizmente o lab. cresceu e junto com ele fomos nós. Muito obrigada pela paciência e compreensão pelo meu humor extremamente oscilante. À turma recente, Bruno Cabral, Aline Lara, Cynthia Val, Pollyana Pimentel (Judite também, é claro), Renata Rocha, Diego Rodney, Isabela Avelar, Júlia Castro, Allysson Cramer. À Melisa Glaudrón pelo incentivo e ajuda. A todos vocês deixo o meu muito obrigada pela troca de dúvidas, questionamentos, experiências, angústias, alegrias, a diversão ao longo dos experimentos, a discussão de resultados, a companhia e amparo nos congressos e a participação nos trabalhos. Aos colegas que trabalharam conosco, mas que não fazem mais parte da equipe. A todos, o mais importante agradecimento é a paciência que tiveram comigo em uma das mais difíceis artes, a arte de conviver. Serei eternamente grata.



Às Prof<sup>as</sup>. Vanessa Pinho da Silva pela pronta disposição sempre que foi preciso; Danielle da Gloria pela ajuda quando da ausência da minha orientadora e pela colaboração; Milene Rachid pela paciência com as extensas e prolongadas questões histológicas.

Ao Prof. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo pela primeira acolhida da minha carreira científica, pelas contínuas oportunidades, pela prontidão sempre que necessito de ajuda e pelo constante incentivo. Ao Prof. Anderson Miyoshi e aos colegas do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), também pela acolhida inicial.

À Prof<sup>a</sup>. Glória Regina Franco pela oportunidade, por acreditar em minha capacidade e compreensão da escolha que fiz. Aos colegas do Laboratório de Genética e Bioquímica (LGB) que mesmo com minha breve passagem receberam-me muito bem.

À Prof<sup>a</sup>. Santuza Maria Ribeiro Teixeira que foi extremamente receptiva e empenhada em indicar a minha atual orientadora. Além disso, agradeço por sempre ser solícita quando procuro ajuda.

Ao Prof. Mauro Martins Teixeira por abrigar nosso laboratório em seu grupo de pesquisa. Aos membros do Imunofar que estão sempre dispostos a ajudar durante os experimentos, dúvidas e discussões. Em especial a Franck pelas ajudas com o citômetro, a Ilma pelo socorro com os materiais, a Vivi Vasconcelos pelo auxílio com as LLC-MK2, ao Prof. Frederico Soriani pelas dicas iniciais com as reações de qPCR, ao Thiago Ávila pela ajuda em um extenso experimento em um dia em que eu passava mal, além

da paciência com minhas intermináveis perguntas sobre as sondas, aos colegas da biologia molecular, que pacientemente sanaram inúmeras dúvidas, Lucas Secchim, Daniel Cisalpino, Fernando Roque e Carol Fialho. Sou grata a todos.

À Prof<sup>a</sup>. Leda Quércia Vieira pela colaboração, disponibilidade, informações, sugestões e incentivo. Aos integrantes do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia (LAGI) Grazi, Caio, Paula, Léo, Lili, Juan, Daniel, em especial ao Matheus pelos intermináveis experimentos de ROS, os pedidos por zymosan e pela praia em Caxambu, ao Dionnê pelos afetuosos abraços e principalmente pela troca de boas energias a cada vez que eu entrei no LAGI. A vocês o meu muito obrigada pela boa vizinhança e por atenderem aos meus inúmeros pedidos de “empréstimos”.

Ao Prof. Jader dos Santos Cruz pelo constante apoio e incentivo.

Ao Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha pelas discussões, valiosos ensinamentos e a sabedoria de que “nós não nos fazemos sozinhos”.

Ao Prof. Herbert Bernard Tanowitz pelo estímulo e afetuosos parabéns ao final de uma apresentação.

Aos que, apesar de não contribuírem cientificamente, foram meu suporte e incentivo para que eu realizasse este trabalho. Aos familiares mais próximos, obrigada por acompanharem e torcerem bem de perto pela minha realização. Aos amigos por

pacientemente entenderam minha ausência em muitos momentos e aos amigos da dança que com essa arte ajudaram-me a suportar o cansaço e a pressão do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq) da UFMG pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O receptor aril-hidrocarbono (AhR) é uma proteína caracterizada como um fator de transcrição, ativado por ligante, que tem sido descrito como um potencial alvo para intervenções terapêuticas. Frente a infecção por *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium berghei* ANKA a ausência de AhR resulta em disfunção do sistema nervoso central. Entretanto, o papel de AhR na infecção por *Trypanosoma cruzi* ainda não tem sido bem explorado. *T. cruzi* é o protozoário parasita causador da doença de Chagas, que é uma importante doença negligenciada. Demonstramos neste trabalho que a expressão de mRNA de AhR é regulada positivamente no coração e no baço durante a infecção por *T. cruzi*, e a deficiência desse receptor resulta em aumento da resistência contra a infecção, antecipação da resposta imune e redução da inflamação no coração. A resistência dos macrófagos deficientes de AhR está provavelmente associada com a produção reduzida das espécies reativas de oxigênio (ROS) que resulta na inabilidade do parasita de se multiplicar *in vitro*. Contudo, é provável que *in vivo* essa resistência esteja relacionada com o aumento da geração de ROS e da produção de citocinas inflamatórias, mas não com o aumento de óxido nítrico. Esta é, para o nosso conhecimento, uma demonstração sobre o papel de AhR na resposta imune e produção de ROS durante a infecção experimental por *T. cruzi*.

## ABSTRACT

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a known ligand-activated transcription factor which has been described as a potential target for therapeutic interventions. Upon *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium berghei* ANKA infection, the absence AhR results in central nervous system dysfunction. However, the role of AhR in *T. cruzi* infection has not been well explored. *T. cruzi* is a protozoan parasite that causes Chagas disease, an important neglected illness. Herein, we demonstrated that AhR mRNA is modulated during *T. cruzi* infection in spleen and its deficiency results in higher resistance, an anticipate immune response and in lower heart inflammation. The greater control of the infection in AhR deficient mice is probably associated decreased levels of reactive oxygen species (ROS) resulting in inability of parasite to growth into the macrophages *in vitro*, but *in vivo* associates with increased inflammatory cytokines and ROS production, but not with nitric oxide. This is, to our knowledge, a demonstration about the role of AhR in the modulation of immune response and ROS production during the experimental *T. cruzi* infection.

## SUMÁRIO

<i>CONSIDERAÇÕES INICIAIS</i>	<u>15</u>
<i>INTRODUÇÃO</i>	<u>17</u>
<i>REVISÃO DA LITERATURA</i>	<u>19</u>
<i>OBJETIVO</i>	<u>35</u>
<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	<u>37</u>
<i>RESULTADOS</i>	<u>47</u>
<i>DISCUSSÃO</i>	<u>59</u>
<i>CONSIDERAÇÕES FINAIS</i>	<u>64</u>
<i>CONCLUSÕES</i>	<u>66</u>
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	<u>68</u>
<i>ANEXO I – Ata da defesa</i>	<u>77</u>
<i>ANEXO II – Folha de aprovação</i>	<u>79</u>
<i>APÊNDICE - Artigo científico</i>	<u>81</u>

# CONSIDERAÇÕES INICIAIS

*“Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca, não aprendo nem ensino.”*

Paulo Freire

Desde a descrição inicial da doença de Chagas, que tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*, substanciais avanços têm sido evidenciados na elucidação dos relevantes componentes moleculares da resposta imune. Entretanto, mesmo após mais de 100 anos de estudos sobre esta doença cerca de 7 a 8 milhões de pessoas estão infectadas, os custos para tratamento dos indivíduos doentes são altos, os tratamentos existentes ainda não são satisfatórios, principalmente na fase crônica, a doença ainda é negligenciada e várias questões permanecem obscuras (WHO, 2014). Sendo assim, nosso estudo relaciona-se com a linha de pesquisa básica, em imunologia e pretende elucidar parte da via imunológica envolvida na resolução da infecção e desenvolvimento de patologias com possibilidade de estender-se a pesquisa aplicada. Desta forma, visamos colaborar com um melhor entendimento da doença de Chagas, o que posteriormente pode ajudar na elaboração de tratamentos das patologias desenvolvidas nessa doença ou até mesmo de medidas preventivas mais eficientes.

Este estudo foi realizado por meio do modelo experimental murino (CETEA/CEUA UFMG 089/10) no Laboratório de Imunorregulação de Doenças Infecciosas (LIDIN), Departamento de Bioquímica e Imunologia - Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os dados obtidos durante o período de execução do projeto foram constantemente discutidos em congressos por meio de apresentações orais e pôsters.



# INTRODUÇÃO

*“... aprender não é um ato findo. Aprender é um exercício constante de renovação.”*

Paulo Freire

Durante a infecção por *Trypanosoma cruzi* é essencial para o controle do crescimento do parasita, e para o não desenvolvimento de patologia, que a homeostase da resposta imune seja mantido. Para isso, uma imunidade inicial contra o parasita rapidamente orquestrada é muito importante. Esse passo é crítico para o estabelecimento de um equilíbrio da relação entre o patógeno e o hospedeiro e permite, na maioria dos casos, que a infecção progrida dessa fase inicial aguda para uma infecção latente com consequente sobrevivência de ambos. Na fase crônica da doença a intensidade da resposta imune efetora contra *T. cruzi* está diretamente relacionada ao desenvolvimento da miocardite chagásica tanto em modelos experimentais como em pacientes. Portanto, o entendimento dos mecanismos de controle da resposta imune durante essa infecção é de extrema importância (Torrice *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1992; Aliberti *et al.*, 1996).

O receptor aril-hidrocarbono (AhR) foi descrito como um dos receptores de lipoxina (LXA)<sub>4</sub>, um eicosanoide anti-inflamatório, e sua ativação resulta na indução do supressor de sinalização de citocina (SOCS) 2 em células dendríticas e produção de citocinas anti-inflamatórias durante a infecção por *Toxoplasma gondii* (Machado *et al.*, 2006). SOCS2 foi recentemente descrito como uma importante proteína para a função cardíaca durante a infecção por *T. cruzi* (Esper *et al.*, 2012). Esses dados nos levaram a hipótese desse trabalho de que AhR exerce um papel biológico no controle da resposta imune contra *T. cruzi* e dessa forma modula a expressão/função de SOCS2. Como ainda não se sabe se AhR induz SOCS2 ao longo desta infecção, justifica-se a realização de experimentos que compreendem técnicas *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, para definir a participação AhR durante a infecção por *T. cruzi*.

# REVISÃO DA LITERATURA

*Verbetes*

*Autodidata – Ignorante por conta própria.*

Mário Quintana

Recentemente um vasto número de trabalhos têm descrito diversos ligantes para o receptor aril-hidrocarbono (AhR) e as diversas possibilidades de respostas fisiológicas que resultam da interação de cada um desses ligantes com esse receptor. Se pudéssemos personificar o AhR diríamos que ele é extremamente social, e isso se deve ao fato dele possuir uma ampla variedade de ligantes. Entretanto, na década de setenta, o que hoje é conhecido como AhR, foi inicialmente associado apenas como um possível receptor para 2,3,7,8-Tetraclorodibenzodioxina (TCDD), que é um poluente altamente tóxico (Poland *et al.*, 1974).

Dois anos depois o mesmo autor demonstrou, em células hepáticas, que TCDD se ligava ao ainda desconhecido receptor. Essa ligação resultava na indução da atividade da aril hidrocarboneto hidroxilase (AHH ou CYP1A1), e esta enzima provavelmente não era o único produto induzido por meio dessa interação (Poland, Glover e Kende, 1976). Os estudos de Poland foram de extrema importância, pois partiu deles as primeiras ideias sobre a existência do receptor. Outro fato importante foi a síntese de um ligante com características de foto afinidade (2-azido-3-iodo-7,8-dibromadibenzo-p-dioxin), que possibilitou que o AhR fosse isolado posteriormente (Poland *et al.*, 1986).

Hoje sabemos que AhR é uma proteína composta por 848 aminoácidos, que pesa cerca de 100 kilodaltons (kDa) e que atua como fator de transcrição geralmente dependente de ligante. Localiza-se no citoplasma e após ser ativada pelo ligante é translocada para o núcleo. É expressa em todo o corpo, principalmente em barreiras de entrada de patógenos e poluentes tais como pele, pulmão e intestino. Essa localização permite que o receptor auxilie na identificação e sinalização, para o sistema imune, da presença de fatores nocivos ao organismo, atuando, dessa forma, como um sensor ambiental e possível alvo terapêutico (Quintana, 2013). Análises filogenéticas demonstraram que AhR é uma proteína altamente conservada. Na escala evolutiva ela

está presente em todos os grupos vivos dos vertebrados em diante e há a possibilidade de haver homologia em invertebrados. (Hahn *et al.*, 1997).

Grande parte do que foi descrito até o momento foi elucidado com a indução de AhR por poluentes e ligantes exógenos como: hidrocarbonos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilas policloradas (PCBs) e hidrocarbonos aromáticos halogenados (HAH). Muitos outros compostos químicos têm relação com esse receptor, mas a maioria deles atua fracamente como indutores se comparados ao TCDD. Isso se deve ao fato de que, geralmente, os compostos halogenados são os que possuem maior afinidade pelo AhR (Stejskalova, Dvorak e Pavek, 2011).

Além dos ligantes exógenos, sabe-se que AhR é suscetível à indução por vários compostos endógenos ou ainda pode ser induzido até mesmo na ausência de ligantes (Denison *et al.*, 2011; Quintana e Sherr, 2013). Um ligante endógeno que tenha grande afinidade pelo receptor, tal como TCDD, ainda não foi identificado, por isso, AhR é considerado um receptor órfão. Três fatores dificultam a identificação de ligantes endógenos: 1) o local e concentração do suposto composto, pois as quantidades necessárias para ativar o receptor podem ser pequenas e a atuação pode ser muito pontual; 2) a comprovação da ativação do receptor é feita, principalmente, pela quantificação de CYP1A1. Entretanto, como CYP1A1 não tem um papel fisiológico em muitos processos patológicos, não é de se esperar que todos os ligantes endógenos liguem-se a AhR para induzir quantidades mensuráveis de CYP1A1; 3) o ligante pode ser um composto instável o que dificulta a identificação como ligante ou metabólito.

Mesmo com estas limitações, vários ligantes já foram identificados: curcumina; carotenoides e flavanóides (quercetina); índigo e idirubina (metabólitos do triptofano); 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) (um fotoproducto da radiação U.V.); bilirubina e biliverdina; prostaglandinas; lipoxina (LXA) A<sub>4</sub>, 2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-

*carboxylic acid methyl ester 2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester* (ITE) e outros compostos (Schaldach, Riby e Bjeldanes, 1999; Song *et al.*, 2002; Quintana, 2013). Por fim, na indução que ocorre na ausência de ligante, essa ativação pode ocorrer de maneira pós traducional ou pelo aumento das concentrações de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) que levam a translocação nuclear e indução de genes alvos em células Hepa1c1c7 (Oesch-Bartlomowicz *et al.*, 2005).

AhR encontra-se no citosol de diversas células como um complexo formado por proteínas de choque térmico (HSP) 90, *hepatitis B vírus X-associated protein 2* (XAP2 ou ARA9 ou AIP) e a proteína quinase c-SRC. Quando o ligante entra em contato com o receptor ocorre uma mudança conformacional. Dessa forma a HSP90 se dissocia do complexo citosólico com consequente translocação do AhR para o núcleo, local onde ocorre a heterodimerização dele com o translocador nuclear (ARNT). O complexo heterodimérico reconhece elementos responsivos à dioxina (DRE), que são sequências nos promotores capazes de recrutar co-ativadores e induzir a transcrição de genes alvo (Denison, Fisher e Whitlock, 1988b; a; Petrulis *et al.*, 2003).

Alguns dos genes descritos como regulados por AhR são a cyclooxygenase-2 (catalisa a conversão de ácido araquidônico a prostaglandinas) (Martey *et al.*, 2005); a quimiocina CCL1 (quimiotaxia de monócitos) (N'diaye *et al.*, 2006); a proteína supressora de sinalização de citocinas (SOCS) 2 (Boverhof *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2006); a distrofina Dp71 (distrofia muscular Duchenne) (Bermúdez De León *et al.*, 2006); complexo principal de histocompatibilidade (MHC) Q1<sup>b</sup> (Dong, Ma e Whitlock, 1997) e o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (NrF2) (antioxidante em locais com estresse oxidativo) (Marchand, Barouki e Garlatti, 2004).

O fenótipo observado em camundongos AhR *knock-out* (KO) e a indução de AhR por TCDD permitiram elucidar algumas funções fisiológicas de AhR como:

deficiência reprodutiva (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995); desenvolvimento vascular (Lahvis *et al.*, 2000) e homeostase do sistema endócrino (Nishimura *et al.*, 2005). Há associação da exposição de dioxinas com mudança no número e função de linfócitos (Neubert *et al.*, 1993; Tonn *et al.*, 1996). Já foi descrito que em modelos murinos o TCDD tem capacidade de alterar a resposta humoral dependente de células T, e dessa forma, suprimir a produção de anticorpos (Vecchi *et al.*, 1980) o que conseqüentemente leva a redução de células T de memória (Dooley e Holsapple, 1988). A ativação de AhR pode inibir diretamente a ativação de células T e a sua subsequente diferenciação, o que resulta na supressão da proliferação de células T auxiliares e células B (Nohara *et al.*, 2005).

Quando ativado por TCDD, AhR pode induzir uma supressão potente da resposta imune adaptativa (Funatake *et al.*, 2004) o que pode interferir na expressão de MHC de classe II em algumas células apresentadoras de antígenos (APC) (Shepherd *et al.*, 2001) e até mesmo inibir a atividade de neutrófilos (Ackermann *et al.*, 1989). Foi sugerido também que a ativação de AhR por TCDD pode resultar na imunossupressão em camundongos pela indução de células T reguladoras (Treg) (Funatake *et al.*, 2005). Entretanto, muitos autores têm sugerido que o efeito supressor de AhR não esteja relacionado com a geração de células supressoras, mas que o receptor esteja ativando células T efetoras de tal forma a chegar a indução da apoptose delas, e principalmente, que o TCDD, e não outras dioxinas, tem um mecanismo de ação que é independente de AhR (Camacho, Nagarkatti e Nagarkatti, 2002; Singh, Nagarkatti e Nagarkatti, 2008; Funatake *et al.*, 2009). Outros estudos reforçaram essa ideia quando demonstraram a importância de AhR no desenvolvimento das células Th17. A diferenciação *in vitro* de Th17 dependente de AhR foi demonstrada por (Veldhoen *et al.*, 2008), quando com o uso de um antagonista houve a diminuição da quantidade de células Th17 diferenciadas.

Quando em contato com o agonista FICZ, a ativação de AhR levou a aumento do número de células Th17 e a produção de IL-17 de forma dose-dependente (Kimura *et al.*, 2008).

Dessa forma, o vasto número de ligantes, genes induzidos e funções fisiológicas demonstram que AhR exerce diversas funções importantes. Por isso, devido ao envolvimento com a resposta imune e com o caráter de sensor ambiental e fisiológico, seu papel ao longo de várias infecções vem sendo estudado. Durante a infecção experimental por *Listeria monocytogenes* os camundongos AhR *knockout* são mais susceptíveis a infecção do que os heterozigotos, frente a uma primeira infecção. Entretanto, os animais *knockouts* não demonstraram diferença na resistência adquirida a infecção e nem na produção de citocinas pelas células T. (Shi *et al.*, 2007). Na encefalomielite autoimune experimental (EAE), modelo experimental da encefalomielite humana, AhR é capaz de regular a diferenciação de Treg e Th17. Quando o receptor é ativado por TCDD há indução de células Treg que resultam na supressão da EAE. Entretanto, quando o receptor foi ativado por FICZ houve interferência no desenvolvimento das células Treg e aumento na diferenciação das células Th17 e, dessa forma, aumentou a severidade da doença nos camundongos (Quintana *et al.*, 2008). Frente a infecção experimental por *Leishmania major* os camundongos deficientes de AhR tiveram menor número de parasitas nas feridas da pata quando comparados com os WT, Essa diferença pode estar associada com um aumento no início da infecção da citocina pro-inflamatória TNF e com a redução de células Treg nos camundongos AhR KO. (Elizondo *et al.*, 2011). Na infecção experimental por *Plasmodium berguei* ANKA, os camundongos deficientes de AhR tiveram aumento na parasitemia, mortalidade anterior a dos WT, aumento de IL-17 e IL-6 no cérebro, aumento de IFN- $\gamma$  e TNF no baço. Além disso, AhR também foi



descrito com capacidade de controlar a expressão de SOCS3 no cérebro (Brant et al., 2014).

As proteínas da família SOCS medeiam as próprias ações ligando-se aos domínios intracelulares dos receptores de citocinas ou hormônios, prevenindo a ligação e ativação de elementos “*downstream*” à sinalização (Alexander e Hilton, 2004). Algumas proteínas SOCS também facilitam a degradação dependente de proteossoma de fatores de transcrição através da indução de ubiquitinação (Kile *et al.*, 2002; Alexander e Hilton, 2004), via poliubiquitinação catalisada pelo complexo ElonginasBC/Culin-2 ligados ao domínio SOCS-box no carboxi-terminal das proteínas SOCS. A família de proteínas SOCS compreende oito elementos denominados CIS e SOCS1 até SOCS7. SOCS1, SOCS2 e SOCS3 têm sido os membros mais estudados e são associados com a supressão de transdução da sinalização de citocinas pela inibição da atividade da proteína Janus kinase (JAK). SOCS1 desempenha um papel importante como um regulador negativo da sinalização de IFN- $\gamma$ , enquanto SOCS3 tem uma função dual, uma vez que é capaz de inibir simultaneamente a cascata de sinalização desencadeada por citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias tais como IL-6 e IL-10 (Delgado-Ortega *et al.*, 2013). Já foi bem descrito que a família SOCS tem regulação cruzada e que SOCS2 pode influenciar a atividade de outros membros da família, como por exemplo SOCS1 e SOCS3 (Delgado-Ortega *et al.*, 2013). SOCS2 é induzido por LXA<sub>4</sub> e ATLs e associa-se com TRAF2 e TRAF6, moléculas adaptadoras essenciais para o desenvolvimento das respostas imune inata e adaptativa (Choi, 2005; Machado *et al.*, 2006). Na toxoplasmose experimental SOCS2 é o mediador essencial das ações anti-inflamatórias de LXAs pela ativação de AhR (Machado *et al.*, 2006). Durante a infecção experimental por *T. cruzi* foi demonstrada a provável relação de LXAs com a

indução de SOCS2, mas a importância de AhR, neste modelo, ainda é desconhecida (Esper *et al.*, 2012).

Com toda essa diversidade de atuação, podemos concluir que a indução de AhR pode gerar diferentes respostas inflamatórias, de forma célula e contexto específico, e o entendimento da sua atuação em outras vias demonstra-se importante. Como citado anteriormente, durante a infecção por *T. gondii* foi observado, em células dendríticas, o envolvimento de AhR nessa infecção. No entanto durante a infecção por *T. cruzi*, o papel de AhR na indução de SOCS2, quando ativado por LXA<sub>4</sub> ainda é desconhecido. O único estudo que envolve AhR e a infecção por *T. cruzi* demonstrou que, tanto células B primárias humanas quanto de camundongos, expostas a trans-sialidase do parasita *in vitro*, tiveram a mucina CD45 da superfície celular modificada. Tal mudança levou a produção de IL-17 por meio de um programa transcricional independente dos fatores de transcrição AhR e ROR $\gamma$ t (Bermejo *et al.*, 2013). Entretanto, como em várias outras células AhR pode estar envolvido com o fenótipo imunológico, é de extrema importância entender a atuação deste receptor ao longo da doença de Chagas.

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase Americana foi descoberta e descrita em 1909 em um trabalho pioneiro do médico Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (Chagas, 1909). A doença tem como agente etiológico o *T. cruzi*, um hematozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastidae, à família Tripanosomatidae (Chagas, 1909). A espécie *T. cruzi* surgiu há cerca de 150 milhões de anos, infectando, originalmente, mamíferos primitivos dispersos através da Laurásia e Gondwana, regiões que originaram o que hoje são as Américas do Norte e Sul, respectivamente (Briones *et al.*, 1999). O *Homo sapiens* é um hospedeiro evolutivamente muito recente para o *T. cruzi*. Tal fato tem sido atestado através da detecção de DNA do parasito em múmias com cerca de 9.000 anos encontradas no norte

do Chile e sul do Peru (Aufderheide *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2009). Além de ser encontrada principalmente na América Latina, a doença de Chagas tem sido detectada, nas últimas décadas, nos Estados Unidos da América, Canadá, muitos países europeus e alguns países do Pacífico Ocidental. Atualmente, estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas pelo parasita. Isso ocorre devido ao fluxo de migração da América Latina para o resto do mundo (WHO, 2014).

Assim como acontece em outras doenças tropicais negligenciadas, a pobreza associa-se fortemente com a doença de Chagas. Isso se deve ao fato de que muitos indivíduos infectados sofrem por invalidez permanente e mortalidade precoce, principalmente na faixa de idade mais produtiva da vida. Além disso, indivíduos da zona rural têm dificuldade de acesso a serviços de saúde, dificultando o diagnóstico precoce e tratamento da doença, e mesmo quando possuem tratamento, muitas vezes, não têm alimentação adequada comprometendo assim a recuperação e o retorno ao trabalho. A manutenção das condições que relacionam a doença e a pobreza contribuem para a perpetuação de condições precárias de sobrevivência e subdesenvolvimento em vários países da América Latina (Franco-Paredes *et al.*, 2007). Apesar de estarmos há mais de um século da descrição da doença e do aumento da investigação científica na área, a doença de Chagas ainda representa um grave problema de saúde pública na América Latina e é reconhecida como uma das principais doenças tropicais negligenciadas no mundo (WHO, 2014).

Com relação à transmissão do parasito, são apontados atualmente três tipos de possíveis ciclos: o silvestre, envolvendo os triatomíneos e os mamíferos selvagens; o doméstico caracterizado pela presença de triatomíneos no ambiente domiciliar capazes de transmitir o *T. cruzi* de animais domésticos para humanos e entre humanos; e o peridoméstico, originado do ciclo silvestre e posteriormente mantido pelos triatomíneos

e animais peridomiciliados. A junção dos três ciclos é mantida por mamíferos (camundongos, morcegos e gambás) e triatomíneos (*Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *T. sordida* e *T. pseudomaculata*), infectados com *T. cruzi* ou por animais domésticos (cães e gatos), infectados durante caçadas (Coura e Dias, 2009).

A presença de triatomíneos infectados com *T. cruzi*, e potencialmente capazes de transmitir o parasita para seres humanos, abrange uma vasta área geográfica no continente Americano, colocando milhões de pessoas em risco de se infectarem. Os triatomíneos habitam usualmente em fendas de casas de madeira e/ou barro e têm hábitos noturnos, quando se alimentam de sangue (repasto sanguíneo). A picada do barbeiro geralmente ocorre em áreas expostas do corpo e o indivíduo picado, por sua vez, carrega acidentalmente as fezes do barbeiro infectado com *T. cruzi* para o local da picada, para os olhos, para boca, ou para qualquer lugar na pele em que haja uma lesão. A forma infectiva é a tripomastigota metacíclica (alongada com flagelo, o que facilita o movimento) (Teixeira *et al.*, 2006). Após a infecção, as formas tripomastigotas penetram em vários tipos de células do hospedeiro. Intracelularmente, os parasitas escapam do vacúolo parasitóforo e diferenciam-se em formas amastigotas (forma ovóide e sem flagelo), que se reproduzem assexuadamente por fissão binária no citoplasma celular. Tal fato pode levar à degeneração e morte da célula hospedeira uma vez que há grande número e movimentação intensa dos tripomastigotas. Essas formas flageladas são liberadas no sangue, e no sistema linfático, e são capazes de infectar outras células do corpo, causando lesões, principalmente, em tecidos musculares cardíacos e lisos (Teixeira *et al.*, 2006).

Os barbeiros no ato do repasto sanguíneo ingerem os tripomastigotas do sangue, e no estômago do invertebrado, a forma tripomastigota começa a adquirir aspectos arredondados, alguns se tornando esferomastigotas (protozoário com longo flagelo

colado ao corpo) e outros epimastigotas (protozoário com flagelo curto). Ao chegar ao intestino, mais precisamente na porção média, os parasitas se tornam epimastigotas e se multiplicam. Os epimastigotas migram então para o intestino posterior do inseto, se diferenciando para a forma tripomastigota metacíclica, que é eliminada nas fezes e urina durante o repasto sanguíneo, que por sua vez pode penetrar através de feridas ou mucosas no organismo do hospedeiro definitivo, recomeçando assim o ciclo de transmissão da doença de Chagas.

Existem também outras formas de transmissão, além da vetorial, sendo elas: a congênita; por transfusão de sangue ou de órgãos; e por ingestão oral. Essas últimas têm sido eleitas como de grande importância epidemiológica por levar a doença para outros países não endêmicos e por ser responsável por surtos recentes de doença aguda. Há ainda, em menor número, as infecções que ocorrem por manuseio de animais e acidentes laboratoriais. (Teston *et al.*, 2013; WHO, 2014).

Vários países da América Latina ainda não criaram programas sustentáveis de vigilância epidemiológica e controle da transmissão vetorial de *T. cruzi*. Além disso, a manutenção do complexo ciclo silvestre de transmissão de *T. cruzi* constitui um imenso reservatório do parasita e representa uma constante ameaça para milhões de indivíduos. A seleção adequada de doadores de sangue, a utilização de testes sensíveis de triagem e a aplicação de um sistema de garantia de qualidade mantêm a segurança dos bancos de sangue. A prevenção da transfusão sanguínea com protozoários depende principalmente da seleção dos doadores. O uso de testes de diagnóstico moleculares avançados, mais precisos e sensíveis, tem reduzido grandemente o risco da aquisição da doença de Chagas transmitida pelo sangue infectado. No Brasil, a transmissão oral representa um importante problema de saúde pública, principalmente na região amazônica. Essa via de transmissão tem recebido maior atenção após um surto da doença em Santa Catarina em

2005, no qual cinco pessoas morreram após a ingestão de caldo de cana contaminado com o parasita. Portanto, a manutenção de sistemas sustentáveis de vigilância epidemiológica e intervenção em casos de surto é essencial para manter o controle da doença (Dias, Silveira e Schofield, 2002; Dias, 2007; Coura e Dias, 2009).

Muitos fatores limitantes, relacionados à complexa história natural da doença de Chagas, tais como: as condições precárias de sobrevivência de populações em risco de infecção, o complexo ciclo de vida e a existência de múltiplos mecanismos de transmissão do parasita, a falta de vacina anti-*T. cruzi*, assim como a escassez ou ausência de sinais e sintomas característicos na fase aguda, representam um grande obstáculo à erradicação da doença. Além disso, é importante ressaltar que as drogas disponíveis para o tratamento de indivíduos infectados, nifurtimox e benzonidazol (BZ), devem ser administradas por longos períodos de tempo, o que leva a graves efeitos colaterais e eficácia apenas na fase aguda, e ocorre também a geração de tolerância (Punukollu *et al.*, 2007; Tarleton, 2007). A ação do BZ pode envolver ligações covalentes e outros tipos de interações de intermediários nitro redutores com componentes do parasita ou até mesmo ligações ao DNA (Coura e Castro, 2002; Dias, 2009). Há evidências que indicam que o nifurtimox e o BZ possuem mecanismo de ação através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. O radical nitro que é formado pela ação do fármaco BZ estaria envolvido com seu efeito tripanocida por meio da formação de ligações covalentes com macromoléculas do *T. cruzi*, por exemplo, DNA e citocromo P450. O BZ aumenta a fagocitose e lisa o *T. cruzi* através de um mecanismo dependente de IFN- $\gamma$ , que inibe o crescimento do *T. cruzi* por meio da ação da enzima NADH-fumarato redutase (DIAS *et al.*, 2009).

Estes medicamentos demonstram eficácia na cura da doença apenas se administrados imediatamente após a infecção. O tratamento é indicado também para

pessoas em que a infecção foi reativada, por exemplo, por imunossupressão, para crianças com infecção congênita e para pacientes durante o início da fase crônica (WHO, 2014). Os medicamentos nifurtimox e benznidazol, apresentaram entre 50-70% de cura na fase aguda da doença de Chagas, contrastando com valores menores que 20% na fase crônica da doença (Becerra *et al.*, 2012). Mesmo com todos os efeitos colaterais que BZ acarreta aos pacientes, essa ainda é a droga indicada pelos médicos como o fármaco “padrão ouro” (Mejia *et al.*, 2012).

O diagnóstico da doença deve ser apoiado pela clínica e epidemiologia e confirmado pelo diagnóstico laboratorial. O diagnóstico clínico está embasado com a origem do paciente e possíveis sinais de entrada do parasita no organismo como, sinal de Romanã e/ou chagoma de inoculação, que algumas vezes vêm acompanhados por sinais clínicos como: taquicardia, adenopatia, hepatoesplenomegalia, febre irregular e edema. Em conjunto, tais manifestações sugerem a ocorrência da fase aguda da doença de Chagas, mas a confirmação do diagnóstico clínico deve ser feita por meio de métodos laboratoriais. A fase aguda é caracterizada por uma alta parasitemia, que é identificada por observação microscópica de esfregaço sanguíneo fresco, notando-se os parasitas móveis entre as células vermelhas. Além da parasitemia, a presença de anticorpos específicos também auxilia a detecção da doença. (Teixeira *et al.*, 2006). Já na fase crônica, o principal meio de constatação da doença é pela presença de anticorpos específicos, uma vez que a parasitemia é baixíssima. Nesta fase os indivíduos podem apresentarem-se assintomáticos (forma indeterminada), podendo essa fase durar por toda a vida do paciente. Todavia, em cerca de 30% dos pacientes, a doença evolui para uma fase sintomática que pode se caracterizar na forma cardíaca, digestiva, cardiodigestiva ou nervosa (Tanowitz *et al.*, 1992). Portanto, alguns métodos de diagnóstico precisam ser empregados, tais como: métodos parasitológicos e sorológicos.

A confirmação do diagnóstico na fase crônica para a doença de Chagas deve ser feita pelo menos por dois testes sorológicos, o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e a imunofluorescência indireta, testes de alta fidelidade para detectar anticorpos específicos (Teixeira *et al.*, 2006).

Com relação ao sistema imunológico, sabe-se que o sistema mononuclear fagocitário representa um subgrupo dos leucócitos e tem como componentes centrais macrófagos, monócitos e células dendríticas, que derivam de precursores mielóides da medula óssea. No sangue há a presença dos monócitos, que é a forma circulante, e os macrófagos encontram-se nos tecidos e possuem um importante papel durante a inflamação (Geissmann *et al.*, 2010). Algumas evidências sugerem, portanto, que os macrófagos, em vários órgãos diferentes, auto renovam-se sem a reposição de precursores do sangue (Tacke e Randolph, 2006; Junqueira e Carneiro, 2008; Robbins e Swirski, 2010). Durante a fase aguda da doença de Chagas há forte resposta inflamatória para controlar a replicação do parasita, e para isso, ocorre o recrutamento das células da linhagem monocítica (Fabrino *et al.*, 2011).

A forma tripomastigota metacíclica tem a capacidade de invadir uma variedade muito grande de células no local em que foi inoculada, essa invasão às células do hospedeiro vertebrado ocorre pelo reconhecimento entre parasita e célula. Tal processo envolve uma variedade muito grande de moléculas que estão presentes tanto na célula do hospedeiro quanto no *T. cruzi* e pode ser dividido em três estágios: adesão e reconhecimento, sinalização e invasão. (Andrade e Andrews, 2005; Albertti *et al.*, 2010; De Souza, De Carvalho e Barrias, 2010).

Quando ativados, os macrófagos podem produzir altos níveis de citocinas inflamatórias tais como IL-12 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que, com o auxílio de outras células e citocinas, induzem a formação de produtos microbicidas tais



como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que são espécies reativas de oxigênio (ROS), e óxido nítrico (NO). Entretanto, apesar de extensas investigações experimentais, o mecanismo usado pelo macrófago ativado para eliminar o *T. cruzi* ainda não é totalmente entendido. Em murinos, a partir do substrato L-arginina, a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) produz grandes quantidades de NO em macrófagos e cardiomiócitos. O NO é conhecido como uma das moléculas efetoras de *T. cruzi* (Machado *et al.*, 2000; Fabrino *et al.*, 2011). As ROS possuem um efeito citotóxico bem conhecido, mas apesar disso elas apresentam um papel bem diverso para o controle dos tripanosomatídeos. Tal diversidade é devido ao fato de que dependendo da concentração, ROS pode levar à morte do parasita ou participar da sinalização e proliferação celular (Paiva *et al.*, 2012; Menna-Barreto e De Castro, 2014; Paiva e Bozza, 2014). A indução de AhR por TCDD, e outros ligantes, está envolvida com a indução de CYP1A1 que, se for expresso por longos períodos resulta em aumento do metabolismo de agentes químicos endógenos e exógenos, geração das ROS, estresse oxidativo e ativação da sinalização e do ciclo celular (Denison *et al.*, 2011).

Em decorrência da ativação da resposta adaptativa pela ação das APCs no início da infecção, as células T são capazes de produzir inúmeras citocinas que orquestraram a resposta imune, controlando a diferenciação celular, adesão, expressão de moléculas co-estimulatórias, migração e recrutamento, entre muitas outras atividades. Citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , são secretadas pelas células T e estimulam APCs para eliminar o parasita eficientemente. O IFN- $\gamma$  ativa os macrófagos infectados com *T. cruzi* a produzirem NO que, como citado anteriormente, é um importante agente microbicida. A produção de IFN- $\gamma$  é também implicada na indução da produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por macrófagos. (Silva, Machado e Martins, 2003). Por outro lado, as citocinas regulatórias IL-10 e TGF- $\beta$  inibem a ativação de macrófagos mediada por

IFN- $\gamma$ , inibindo a produção de NO, quimiocinas e diferenciação de células produtoras de IFN- $\gamma$ . (Silva *et al.*, 1992; Silva, Machado e Martins, 2003). Portanto, a neutralização de IL-10 endógena aumenta a produção de IFN- $\gamma$ , produção de NO e morte do parasita (Reed *et al.*, 1994; Cardillo *et al.*, 1996).

Coletivamente, esses estudos sugerem que IL-12 e IFN- $\gamma$  favorecem a diferenciação de linfócitos Th1, levando à produção de IFN- $\gamma$  e consequente diminuição de síntese de IL-10, sendo esse mecanismo um fator chave requerido para indução e manutenção do controle da infecção aguda induzida por *T. cruzi*. (Torrico *et al.*, 1991; Aliberti *et al.*, 1996). Dessa forma, entendemos que a interação apropriada entre APCs e células T, e a consequente resposta imune gerada por tais interações, são essenciais para determinar o destino de uma infecção. (Fabrino *et al.*, 2011).

Nesse contexto de resposta imune efetora realizada por APCs, AhR também é relevante. Sabe-se que balanço entre Treg e Th17 é de extrema importância para a homeostase do sistema imune. AhR já foi descrito como regulador da diferenciação tanto de Treg quanto de Th17 de forma dependente do ligante (Quintana *et al.*, 2008; Veldhoen *et al.*, 2008). A combinação dos níveis de citocinas, do tipo de tecido e do ligante envolvido, determina se a ativação de AhR resultará no estímulo ou na supressão de uma resposta imune específica. Como AhR está envolvido com uma resposta imune diversa e o seu papel durante a infecção por *T. cruzi* ainda não foi completamente elucidado, é de extrema importância tentarmos entender qual é essa relação para que futuramente AhR seja um possível e potencial alvo para intervenções terapêuticas durante a doença de Chagas.

## **OBJETIVO**

*“A educação necessita tanto de formação técnica e científica como de sonhos e utopias.”*

Paulo Freire

## **Objetivo Geral**

Como o papel de AhR na modulação da resposta imune durante a infecção experimental por *T. cruzi* ainda não é esclarecido, o presente estudo tem como objetivo estudar o papel deste receptor na indução de vias ativadoras e resolútivas da resposta imune durante essa infecção. Para isso utilizamos o modelo experimental da doença de Chagas, contribuindo desta forma para o surgimento de novas informações descritivas e para o desenvolvimento de novas estratégias preventivas e terapêuticas contra essa infecção que é de grande importância para a saúde pública. Sendo assim, o objetivo geral deste estudo é: Definir o papel de AhR durante a infecção experimental por *T. cruzi* em modelo murino.

## **Objetivos específicos**

- Verificar *in vivo* os níveis de expressão de AhR durante a infecção experimental por *T. cruzi*.
- Acompanhar o curso natural da infecção por *T. cruzi* em camundongos deficientes de AhR,
- Quantificar *in vivo* a produção de moléculas citotóxicas conhecidas como efetoras do *T. cruzi*.
- Avaliar o padrão da produção de citocinas no baço e coração de camundongos deficientes de AhR infectados por *T. cruzi*
- Avaliar a atividade tripanocida e microbiana em macrófagos peritoneais de camundongos deficientes de AhR.
- Quantificar a produção de moléculas citotóxicas em macrófagos deficientes de AhR infectados por *T. cruzi*

## MATERIAL E MÉTODOS

*“We have to recognize that human flourishing is not a mechanical process; it's an organic process. And you cannot predict the outcome of human development. All you can do, like a farmer, is creating the conditions under which they will begin to flourish.”*

Ken Robinson

### **1- Animais de experimentação.**

Foram utilizados camundongos C57BL/6 (tipo selvagem – WT) e *Knockout* (KO) para AhR (AhR KO). Os animais C57BL/6 foram obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e os camundongos AhR KO foram obtidos junto a colônia mantida e criada no biotério de criação do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG. As colônias de criação destes animais foram mantidas em microisoladores dotados de filtro e ventilação no biotério de criação do grupo de Imunofarmacologia do ICB

Os animais experimentais foram mantidos com barreiras ambientais sob condições de temperatura e foto período controladas e receberam ração (Labina, Paulinea, SP, Brasil) e água *ad libitum*. Camundongos fêmeas e machos com idade entre seis a oito semanas foram utilizados nos experimentos. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal/Comissão de Ética no Uso de Animais (CETEA/CEUA) da UFMG, sob o número de protocolo 089/10.

### **2- Infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*.**

Parasitas da cepa Y de *T. cruzi* foram mantidos em camundongos Swiss e utilizados para infecção *in vivo*. Os animais foram inoculados intraperitonealmente com  $10^3$  formas tripomastigotas sanguíneas diluídas em PBS. A parasitemia foi verificada diariamente coletando-se 5  $\mu$ L de sangue da veia caudal dos animais (Machado *et al.*, 2000). Em experimentos realizados *in vitro*, com a cepa Y, foram utilizadas formas tripomastigotas cultivadas e isoladas de células epiteliais de rim de macaco (LLC-MK2). As células LLC-MK2 foram mantidas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>3</sup> com RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e suplementado com 5% de soro bovino fetal inativado (SBF) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 2 mM de L-glutamina (Sigma-

Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, BLR Life Technologies). As culturas foram mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após infecção, replicação e liberação do parasita nestas células foi feita a coleta no sobrenadante seguida de centrifugação a 200 x g por 10 min a 4 °C para sedimentação das células e posteriormente o sobrenadante desta centrifugação foi novamente centrifugado a 1000 x g por 15 min a 4 °C com desaceleração lenta. O número de parasitas foi contado na câmara de Neubauer e a quantidade foi ajustada em uma proporção 5:1 (parasitas/célula) para infecção *in vitro*.

### **3- Dosagem indireta de óxido nítrico sérico.**

A quantidade de nitrito no soro de camundongos WT ou AhR KO infectados com *T. cruzi* foi estimada a partir da realização do método de Griess (Green *et al.*, 1982) após conversão do nitrato, presente no soro, em nitrito. Para o ensaio com soro foram distribuídas na placa de 96 poços 25 µL de cada amostra em duplicata, o branco, que corresponde a 25 µL de PBS, o padrão nitrito, que corresponde 25 µL a 1 mM de nitrito em duplicata, e o padrão nitrato, 25 µL de nitrato a 1 mM. Os padrões foram diluídos em uma proporção de 1:2 em PBS nos poços subsequentes pelo menos 7 vezes para compor a curva. Logo após, 25 µL de uma solução coquetel que consiste em 500 µL de NADPH tetrasodium salt (Merk) a 5 mg/mL em água milli Q estéril, 500 µL de tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 0,5 M e pH 7,5, 500 µL de água milli Q estéril e 1U de nitrato redutase (Sigma-Aldrich Co.) em água milli Q estéril, foi adicionada em todos os poços, exceto no padrão nitrito (Gilliam *et al.*, 1993). A placa foi incubada a 37 °C por 6 horas e logo após foi acrescentado em cada poço 50 µL de solução de Griess que consiste na mistura entre solução de sulfanilamida 1% (sigma-Aldrich Co.) e solução de naphthylethylenodiamida 0,1% (Sigma-Aldrich Co.) ambas diluídas em ácido fosfórico 2,5% (F Maia, Cutia, SP, Brasil). Após 10 minutos no escuro, as placas foram lidas em

espectrofotômetro com um comprimento de onda de 540 nm. A concentração de nitrito (mM) foi determinada tomando como referência a curva padrão (1000 a 13.25  $\mu$ M) de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>) que continha a enzima nitrato redutase (absorbância a 550 nm).

#### **4- Cultura de esplenócitos.**

Suspensões de esplenócitos de animais controles e infectados com *T. cruzi* por 10 dias foram lavadas em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) e tratados com tampão de lise (9 partes de 0.16 mM de cloreto de amônio e 1 parte de 0.17mM de Tris-HCl, pH 7.5) por 4 minutos. As células foram então lavadas três vezes em HBSS e ajustadas para uma quantidade de  $1 \times 10^6$  células/poço em meio RPMI 1640 suplementado como descrito anteriormente. As suspensões celulares foram adicionadas em placas de cultura (Nunc) para realização de marcação com sondas ou preparadas para citometria de fluxo *ex vivo*.

#### **5- Quantificação de NO, ROS e ONOO- em esplenócitos**

Esplenócitos de camundongos foram isolados como descrito acima e incubados por 30 minutos a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> ao abrigo da luz com as sondas *4,5-Diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA, Sigma)*, *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA, Invitrogen)* e *Dihydrorhodamine 123 (DHR 123, Invitrogen)* para detecção de NO, ROS e ONOO- respectivamente como descrito por (Kooy *et al.*, 1994) com modificações. As concentrações foram 10  $\mu$ M de *DAF-2DA*, 50  $\mu$ M de *H2DCFDA* e 25  $\mu$ M de *DHR 123*. A transformação química de *DAF-2DA* é baseada na reatividade das diaminas aromáticas vicinais com NO na presença de dioxigênio. A nitrogenação de *DAF* produz a forma triazol altamente verde fluorescente permitindo a detecção direta de NO com um limite de detecção 5 nM (Kojima *et al.*, 1998). *H2DCFDA*, a sonda que permite a



detecção de ROS, difunde-se pela membrana das células e após desacetilação fica retida no interior delas. Em seguida o composto desacetilado, DCFH, é oxidado pelo peróxido de hidrogênio intracelular dando origem a DCF que é um composto altamente fluorescente (Oyama *et al.*, 1994). *DHR 123* foi utilizada para quantificação de ONOO<sup>-</sup> pois ela é oxidada a rodamina apenas por ONOO<sup>-</sup>, mas não por NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sozinhos, deve haver a combinação desses compostos com ONOO<sup>-</sup> para oxidar a DHR 123 a seu derivado fluorescente rodamina 123 (Haddad *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2003). A fluorescência foi medida em um fluorímetro (Synergy 2, BIOTEK, USA) em um comprimento de onda de excitação de 488 nm e emissão a 515 nm. Os dados estão apresentados como unidades arbitrárias da fluorescência emitida pelas sondas.

## **6- Citometria de fluxo**

Esplenócitos obtidos de animais WT e AhR KO, não infectados ou infectados por 10 dias, foram processados *ex vivo* como descrito acima. As células foram incubadas com Brefeldin A (10 µg/mL) (Invitrogen) por 4 horas, para induzir o acúmulo das proteínas intracelulares. Após incubação, as células foram preparadas para avaliar os marcadores intracelulares, para isso foram fixadas com formaldeído 2% em PBS e, em seguida, foram permeabilizadas com 0,2% de saponina (SIGMA) e incubadas com os anticorpos para CD8 (PERCP), CD4 (PE), IFN-γ (Alexa 488), CD11c (FITC), IL-12 (PE), F4/80 (Alexa 488) (Pharmingen). O volume total de cada um dos tubos foi adquirido usando o FACS-Canto (Becton Dickinson, San José, CA, USA) e as análises foram feitas no programa FlowJo por meio da delimitação de *gates* onde as populações celulares em estudo situam-se de acordo com o seu tamanho e granulosidade e com os marcadores específicos de cada população.

## **7- Cultura de macrófagos**

Macrófagos do peritônio de animais C57BL/6 e AhR KO foram colhidos por lavagem da cavidade peritoneal três dias após a injeção com 2 mL de tioglicolato de sódio a 3% e cantados na câmara de Neubauer usando-se o teste de exclusão por azul de trypan. As células foram lavadas e cultivadas ( $2 \times 10^5$  ou  $10^6$  células/poço) em meio RPMI-1640 suplementado como descrito anteriormente. Após um período de 3 horas de incubação, em placas de cultura a 37 °C em câmara úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, as células não aderentes foram removidas por lavagem. Em seguida foram mantidas nas mesmas condições de incubação citadas anteriormente.

## **8- Atividade microbicida e taxa de infecção em macrófagos do peritônio**

Macrófagos de animais WT e AhR KO foram isolados, cultivados e infectados como descrito anteriormente. A taxa de crescimento intracelular dos amastigotas foi avaliada após fixação das lamínulas com panótico rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil) após 48 horas e a taxa de infecção após 4 horas de infecção dos macrófagos ( $1 \times 10^6$  células/poço). Para representação da quantificação de amastigotas foram contadas 300 células por lamínula (infectadas e não infectadas), e o número total de amastigotas nas células infectadas. Com contagem na câmara de Neubauer a taxa de crescimento também foi avaliada pela liberação de tripomastigotas, do quarto ao sétimo dia após infecção, por meio da contagem destas formas no sobrenadante da cultura dos macrófagos infectados.

## 9- Quantificação de ROS por quimioluminescência em tempo real

Macrófagos obtidos de animais WT e AhR KO foram isolados, cultivados e infectados como descrito anteriormente. Para estabelecer a produção de ROS na cultura de macrófagos infectados por *T. cruzi* foi utilizada a técnica de quimioluminescência em tempo real. Foram cultivadas  $1 \times 10^6$  células por poço em placas opacas de 96 poços (NUNC, Rochester, NY, EUA). Os estímulos/inibidor utilizados foram: tripomastigotas em uma proporção de 5:1 (parasita/célula), zymosan A (Sigma-Aldrich Co.) em uma proporção de 10:1 (partículas/células) e apocinina a 300  $\mu$ M. Em cada poço foi adicionado 0,05 mM de luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona) (Sigma-Aldrich Co.), que reage com ROS resultando em luminescência. O zymosan A é uma substância derivada da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Este composto ativa diretamente os macrófagos através dos receptores semelhantes a Toll *Toll-like* (TLR) 2 e após a fagocitose estas células liberam enzimas lisossomais, espécies reativas de oxigênio, ácido araquidônico e TNF- $\alpha$  (Underhill, 2003). A apocinina foi utilizada como inibidora da produção de ROS uma vez que, em sistemas não vascularizados, ela atua como inibidora da NADPH oxidase, que é uma enzima envolvida com a produção de ROS (Heumüller *et al.*, 2008). Em um primeiro passo, o luminol é reduzido por moléculas reativas como hidróxido ( $\text{OH}\cdot$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que atacam sua ligação dinitrogênica adicionando mais dois oxigênios a um dos anéis, e depois é capaz de combinar com o superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e produzir luz (Faulkner e Fridovich, 1993). Essa forma de radiação foi captada pelo luminômetro (Packard, Waltham, MA, EUA), que mediu a intensidade de luz produzida, por três horas com intervalos de dois minutos entre cada medição e foi então representada como unidades relativas de luz (RLU, em inglês) por segundo.

## 10- Extração de RNA total e produção de cDNA

A extração de RNA total foi realizada utilizando-se coração e baço de animais controles e infectados, de acordo com as recomendações do fabricante do reagente Brazol (LGC Biotecnologia). 1 mL de Brazol foi adicionado para cada 1 mg de tecido. Após homogeneização foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de suspensão. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C e a fase aquosa transferida para um novo tubo. O mesmo volume, correspondente a fase aquosa, de isopropanol foi adicionado, agitado no vórtex e incubado por 20 minutos a -20 °C para precipitação do RNA presente na fase aquosa. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. O sedimento foi lavado em etanol 75% e suspenso em água a uma concentração de 0.5 mg/mL. A quantificação das amostras de RNA foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (Nano Drop Technologies, Wilmington, DE, EUA) sendo a concentração fornecida em ng/μL. A leitura do branco foi realizada com água tratada com dicarbonato de dietila (DEPC). O RNA foi quantificado pela absorbância a 260 nm utilizando-se 1μL da amostra pura. A reação de transcrição reversa do mRNA dos tecidos animais foi realizada utilizando-se 2μg de RNA de cada amostra, aos quais foi adicionado 50μM do *primer* Oligo dT (Promega Cor., Madison WI, EUA). Foi feita uma incubação por 5 minutos a 70 °C e 5 min a 4 °C. Em seguida, foi adicionada uma mistura de reagentes contendo 1μL de dNTPs a 10 mM cada (Promega Cor., Madison, WI, EUA), 4μL tampão M-MLV 5X (Promega Cor., Madison WI,EUA), 200U da enzima Transcriptase reversa-M-MLV (Promega Cor., Madison WI, EUA) e 8,5 μL de água Milli-Q autoclavada. A mistura foi incubada por 2 horas a 42°C quando ocorreu a transcrição reversa do mRNA. As amostras de cDNA foram conservadas a -20 °C.

### 11- Reação em cadeia da polimerase (PCR) tradicional e qPCR

A expressão do mRNA para as citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  foram analisadas por RT-PCR, tendo a  $\beta$ -actina como alvo normalizador. O kit utilizado foi o GoTaqGreen Master Mix (Promega) e a reação de PCR foi feita no termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, MA). As condições da reação foram de 34 ciclos de 1 minutos a 94 °C, 1 minutos a 60 °C e 1 minutos a 72 °C, com uma extensão final de 2 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose e corados por brometo de etídeo. A reação de qPCR foi feita para as citocinas (IL-6, IL-10, IL-12, IL-17A, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), para Foxp3, para as proteínas SOCS1, SOCS2, SOCS3. Os dados foram normalizados para a expressão de 18S ou GAPDH. A reação foi feita no ABI PRISM Step-One sequence-detection system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) e o prepare dela foi feito com SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os níveis de expressão dos genes foram determinados pelo método de análise  $\Delta\Delta C_t$  e apresentados como  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak e Schmittgen, 2001; Schmittgen e Livak, 2008). As sequências dos iniciadores utilizados são as seguintes:

Iniciador	Senso	Anti senso
18S	CTCAACACGGGAAACCTCA	CGTTCACCAACTAAGAACG
AhR	CGGAGCGCTGCTTCTCCAC	GCTGCCCTTTGGCATCACACC
Foxp3	CCCAGGAAAGACAGCAACCTT	TTCTCACAACCAGGCCACTTG
GAPDH	ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA	CGGCCAAATCCGTTACACCGA
IFN- $\gamma$	TGAACGCTACACACTGCATCTTGG	CGACTCCTTTTCCGCTTCCTGAG
IL-6	TTCCATCCAGTTGCCTTCTTG	TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA
IL-10	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
IL-12p40	GCTGGACCCTTGATCTGGCG	GGTGGCCAAAAGAGGAGGTAGCG
IL-17A	TCCAGAAGGCCCTCAGACTA	TGAGCTTCCCAGATCACAGA
SOCS1	GCATCCCTCTTAACCCGGTAC	AATAAGGCGCCCCACTTA
SOCS2	CGCGTCTGGCGAAAGC	TTCTGGAGCCTCTTTTAATTTCTCTT
SOCS3	TTTGCCTTTGATTTGGTTTG	TGGTTATTTCTTTGGCCAGCA
TNF	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	AGATAGCAAATCGGCTGACG

## **12- Histologia do coração e análise morfométrica**

Para compararmos os efeitos da expressão de AhR no influxo de células inflamatórias no coração, nós analisamos o infiltrado inflamatório morfometria. Para este experimento, corações de 5 animais de cada grupo foram removidos 10 e 15 dpi e cortados transversalmente. Cada coração foi lavado em PBS e fixado em 4% de tampão fosfato formaldeído. Após 24 horas de fixação, os tecidos foram embebidos em parafina, e 3 cortes semi-consecutivos (de 5  $\mu$ m de espessura) foram marcados por H&E para avaliação da inflamação. A inflamação no coração foi avaliada 30 campos dos cortes de cada animal marcados por H&E. Os cortes foram randomicamente escolhidos na objetiva de 40X. Imagens foram capturadas pelo aparelho (DEI-470; Optronics, Goleta, CA) conectado ao microscópio (IX70; Olympus, Center Valley, PA) e analisados em Image-Pro Express versão 4.0 (Media Cybernetics) e em software KS300 (Zeiss, Jena, Germany).

## **13- Análise estatística**

A significância estatística das diferenças nos valores entre amostras controles ou Tratadas/infectadas foram analisados pelo teste t Student's (Student's t test), One or Two-way ANOVA ou Two-way ANOVA com o teste de Bonferroni (Graph Prism Software 5.0). As diferenças foram consideradas ser significantes com um  $P$  igual ou < 0.05.

## **14- Elaboração do artigo científico**

O artigo científico em anexo foi elaborado de acordo com as especificações da revista *The Journal of Infectious Diseases* (Oxford Journals, para um *Major Article*. A escolha foi feita de acordo com o perfil do trabalho realizado.

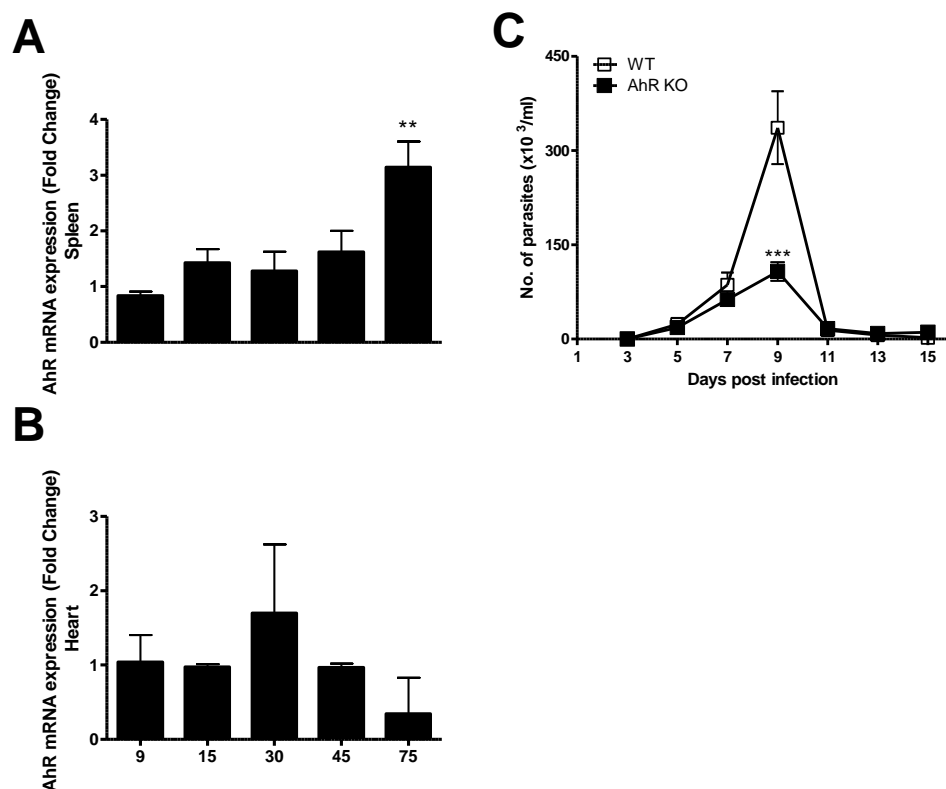
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

*“If you’re not prepared to be wrong, you’ll never come up with anything original.”*

Ken Robinson

## 1- Modulação da expressão de AhR durante a infecção por *T. cruzi*

Para investigar o envolvimento de AhR durante a infecção por *T. cruzi* analisamos por RT-PCR a expressão do gene AhR em relevantes órgãos de camundongos WT infectados. No baço, encontramos aumento nos níveis de mRNA em todos os tempos avaliados após infecção, sendo que o aumento maior foi aos 75 dpi (**Figura 1A**). De forma semelhante, a expressão de AhR no coração aumentou em todos os pontos investigados (**Figura 1B**). Em seguida, investigamos o papel de AhR durante o curso natural da infecção por *T. cruzi* por meio da parasitemia. Observamos que os animais deficientes de AhR apresentaram acentuada redução na parasitemia aos 9 dpi, quando comparados aos animais WT (**Figura 1C**). Estes resultados dão suporte à ideia de que AhR tem um papel importante durante a infecção por *T. cruzi*.



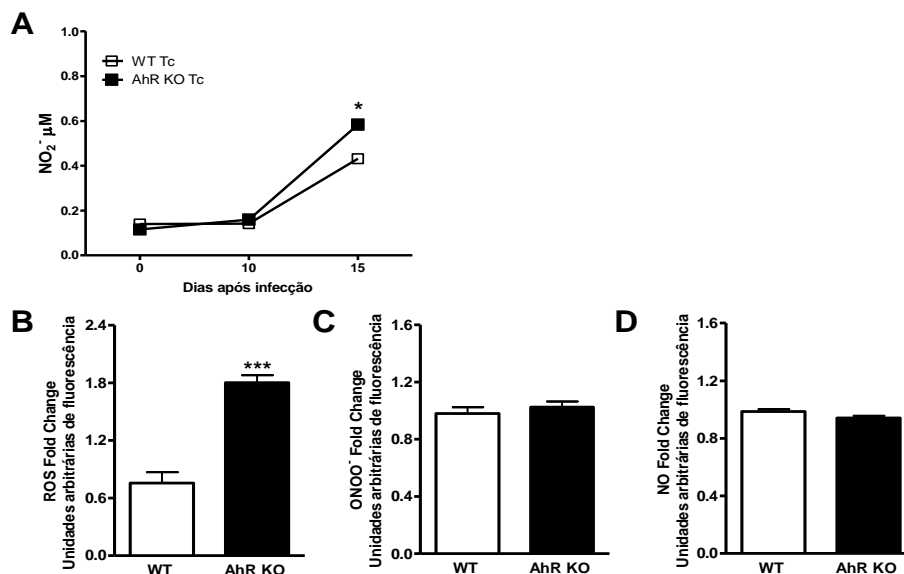
**Figura 1.** AhR é expresso em maiores níveis durante a infecção experimental por *T. cruzi*. Camundongos WT foram infectados por via peritoneal (ip) com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). (A) os baços e os (B) corações foram retirados e processados para análise



da expressão de mRNA por RT-PCR aos 9, 15, 30, 45 e 75 dias após infecção (dpi). Para análise, os dados foram normalizados pela expressão de  $\beta$ -actina e pelo WT não infectado. (C) A parasitemia foi acompanhada a cada dois dias, do terceiro ao décimo quinto dpi, por meio da coleta de 5 $\mu$ L de sangue da veia caudal. Os dados mostram a média e o erro padrão (+/- SEM) do número de parasitas por microlitro de sangue e são representativos de três experimentos independentes \*\*\* $P < 0,001$ \*\* $P < 0,01$

## 2- A infecção por *T. cruzi* aumenta os níveis de ROS, mas não os de NO e de ONOO<sup>-</sup>, em animais deficientes de AhR.

Como as ROS, ONOO<sup>-</sup> e NO são importantes mediadores citotóxicos durante a infecção por *T. cruzi*, decidimos analisar os níveis destas moléculas em animais WT e AhR KO infectados por *T. cruzi*. Para isso medimos os níveis sistêmicos de NO no soro dos animais citados. Os resultados demonstraram que houve diferença na concentração deste composto aos 15 dpi, sendo que AhR KO apresentou um maior aumento quando comparado ao WT (**Figura 2A**). No entanto, este aumento na quantidade de NO, nos camundongos AhR KO, ocorreu apenas posteriormente ao controle da parasitemia nos animais deste grupo (**Figura 1C**). No baço, a deficiência de AhR resultou em um aumento da produção de ROS (**Figura 2B**), mas não houve aumento da produção de ONOO<sup>-</sup> nem de NO (**Figuras 2C e 2D**), quando comparado ao WT, aos 10 dpi. Esses dados sugerem que NO não está envolvido com o aumento da habilidade apresentada pelo camundongo AhR KO de eliminar o parasita no início da infecção. Além disso, indica que, *in vivo*, ROS pode ser um dos responsáveis, entre outros mediadores, pela eliminação do parasita na ausência de AhR.

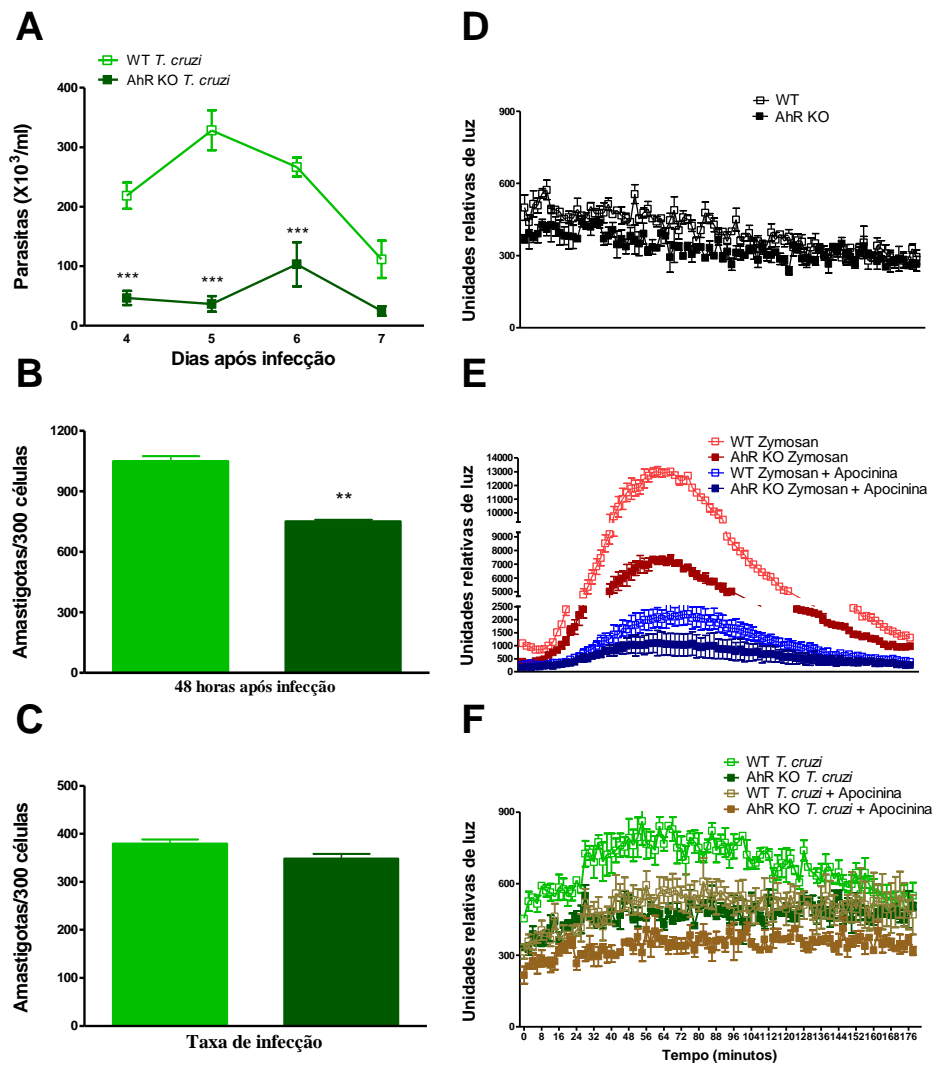


**Figura 2. Aumento da produção de ROS esplênico em camundongos AhR KO durante a infecção por *T. cruzi*.** Camundongos WT e AhR KO foram infectados por via peritoneal (ip) com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). O ensaio de Griess, com conversão prévia de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ , pelo nitrato redutase, foi usado para quantificar (A) os níveis de NO no soro de camundongos WT e AhR KO infectados por *T. cruzi* aos 10 e 15 dias após infecção (dpi). Os baços foram retirados e processados aos 10 dpi para avaliação da produção de (B) espécies reativas de oxigênio (ROS), (C) peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e (D) óxido nítrico (NO), *ex vivo* por reações de fluorescência como descrito em material e métodos. Os dados foram normalizados pelos valores obtidos dos WT e AhR KO não infectados. As representações são de acordo com a média e o erro padrão (+/- SEM) e são representativos de três experimentos independentes \*\*\* $P < 0,001$  \* $P < 0,05$ .

### 3- Deficiência de AhR resulta na redução da produção de ROS e diminuição da carga parasitária em macrófagos.

O entendimento da resposta imune produzida pelos macrófagos é importante tanto para a elucidação do mecanismo pelo qual o hospedeiro é capaz de combater a proliferação de *T. cruzi*, quanto para entender a habilidade desse parasita de evadir à resposta imune do hospedeiro. Quando macrófagos obtidos de camundongos AhR KO, são infectados *in vitro* por *T. cruzi*, é observado um aumento da atividade microbicida. A quantidade de tripomastigotas liberados, assim como, a quantidade de amastigotas no interior dessas células, foi reduzida quando comparado ao perfil encontrado nos camundongos WT (Figura 3A e 3B, respectivamente). Essa diferença na carga

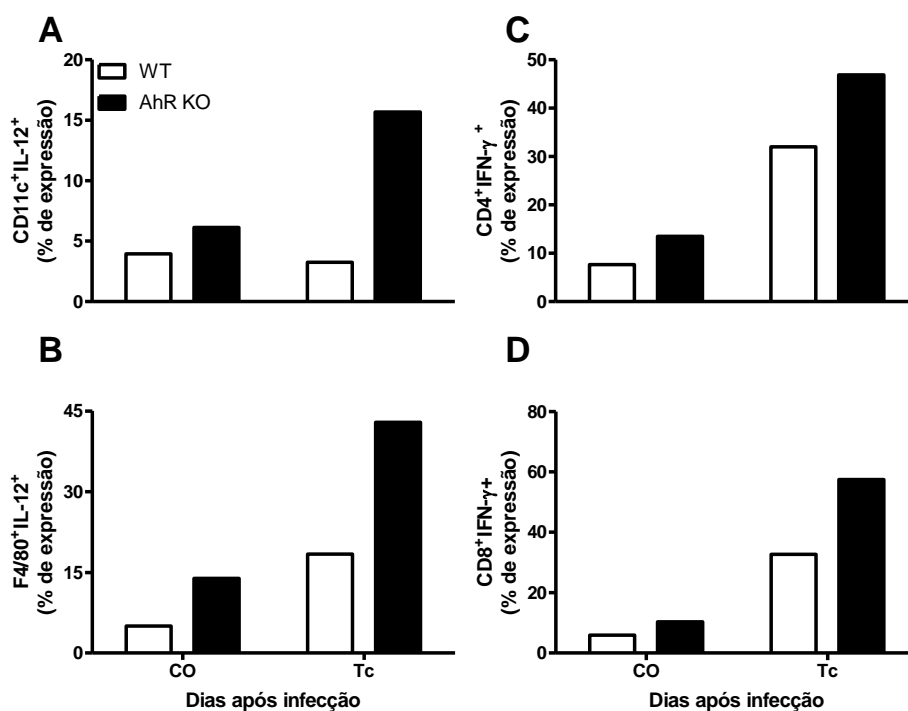
parasitária não está associada com nenhum tipo de alteração na entrada do parasita nas células, uma vez que, no ensaio de entrada do parasita, não encontramos diferença no número de amastigotas dentro dos macrófagos provenientes dos camundongos WT e AhR KO (**Figura 3C**). Em seguida, investigamos a habilidade dos macrófagos deficientes de AhR de produzirem ROS. Nós observamos, *in vitro*, que macrófagos deficientes de AhR não estimulados produzem níveis similares de ROS em comparação aos WT (**Figura 3D**). Entretanto, a deficiência de AhR resultou em uma dramática redução na produção de ROS por macrófagos estimulados com zymosan (**Figura 3E**) e infectados por *T. cruzi* (**Figura 3F**). A adição de apocinina, um composto que inibe a produção de ROS, resultou na redução da produção de ROS pelas células WT e AhR KO, indicando que a produção de ROS pelos macrófagos é parcialmente dependente de AhR. Reunidos, esses dados sugerem que AhR controla os níveis de ROS produzidos por macrófagos infectados por *T. cruzi*.



**Figura 3. Macrófagos deficientes de AhR produzem níveis reduzidos de ROS o que resulta na diminuição da replicação do parasita.** Macrófagos peritoneais de animais WT e AhR KO foram cultivados e infectados por formas tripomastigotas de *T. cruzi* em uma proporção de 5:1 (parasita/célula) e a produção de ROS foi acompanhada como descrito na metodologia. **(A)** Os tripomastigotas liberados no sobrenadante das culturas foram contados diariamente do terceiro ao sétimo dia após infecção (dpi). Macrófagos de animais WT e AhR KO foram infectados por *T. cruzi*, fixados e marcados com **(B)** 48 horas e **(C)** 4 horas (taxa de infecção) após a infecção e as formas amastigotas foram contadas em 300 células. Produção de ROS por macrófagos WT e deficientes de AhR cultivados **(D)** apenas com meio, **(E)** na presença de zymosan e/ou apocinina, e **(F)** *T. cruzi* e/ou apocinina foi determinada. Em **(C-D)** os dados foram apresentados como unidades relativas de luz. Cada ponto representa média e o erro padrão de três experimentos diferentes em triplicatas amostrais. As análises estatísticas foram feitas entre WT versus AhR KO \*\*  $P < 0.01$

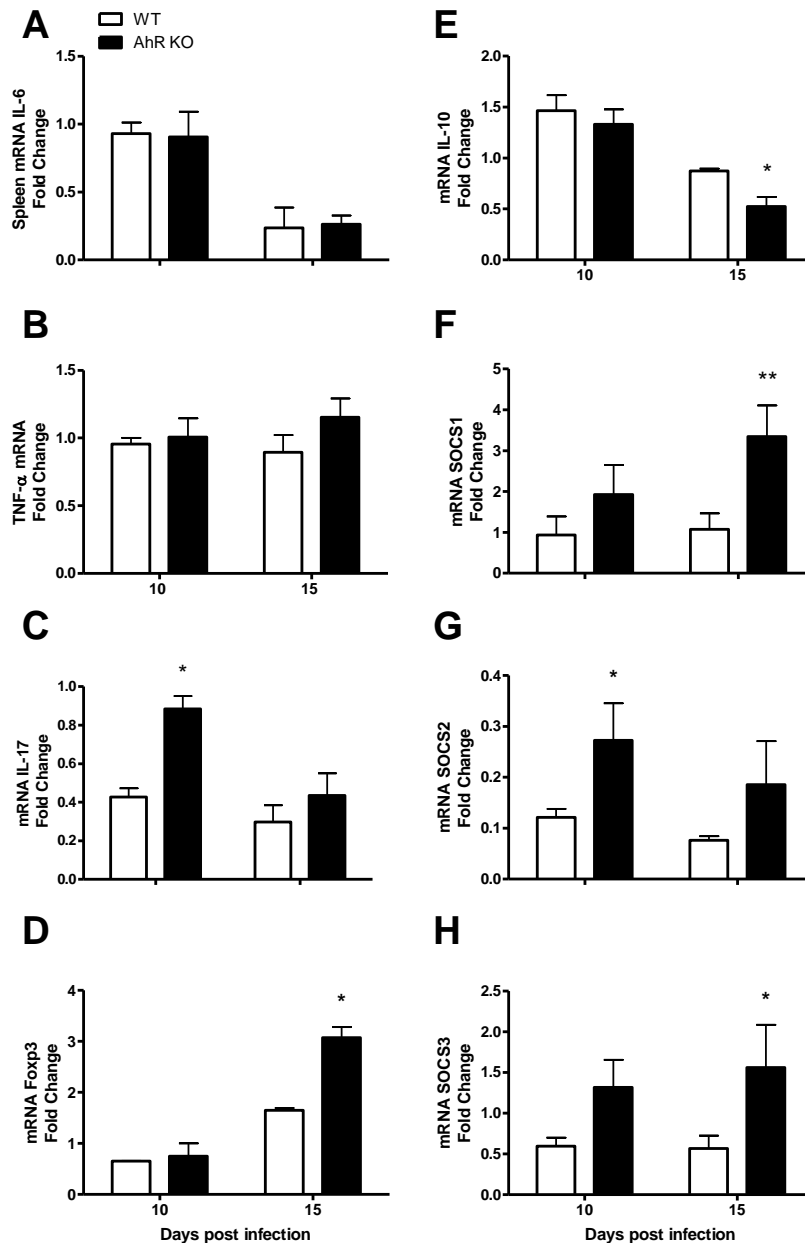
#### 4- Deficiência de AhR resulta em aumento da resposta pró inflamatória no baço de camundongos infectados por *T. cruzi*.

IL-12 e IFN- $\gamma$  são importantes citocinas liberadas durante a resposta imune inata e adquirida para controlar a infecção por *T. cruzi*. Nós analisamos a produção destas citocinas no baço aos 10 dpi. Encontramos uma redução na produção de IL-12 por células CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e F4/80<sup>+</sup> (Figuras 4A e 4B, respectivamente) e de IFN- $\gamma$  por células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Figuras 4C e 4D, respectivamente) de camundongos AhR KO infectados por *T. cruzi* quando comparado aos WT também infectados.



**Figura 4. Resposta inflamatória acentuada é induzida no baço de camundongos AhR KO infectados por *T. cruzi*.** Camundongos WT e AhR KO foram infectados por via peritoneal (ip) com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Os baços foram processados e analisados por citometria de fluxo aos 10 dias após infecção (dpi). A detecção intracelular foi feita para células (A) CD11c<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup>, (B) F4/80<sup>+</sup> IL-12<sup>+</sup>, (C) CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e (D) CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. Os resultados foram apresentados como WT versus AhR KO controles e infectados por *T. cruzi*. São representativos de um pool de três animais por grupo.

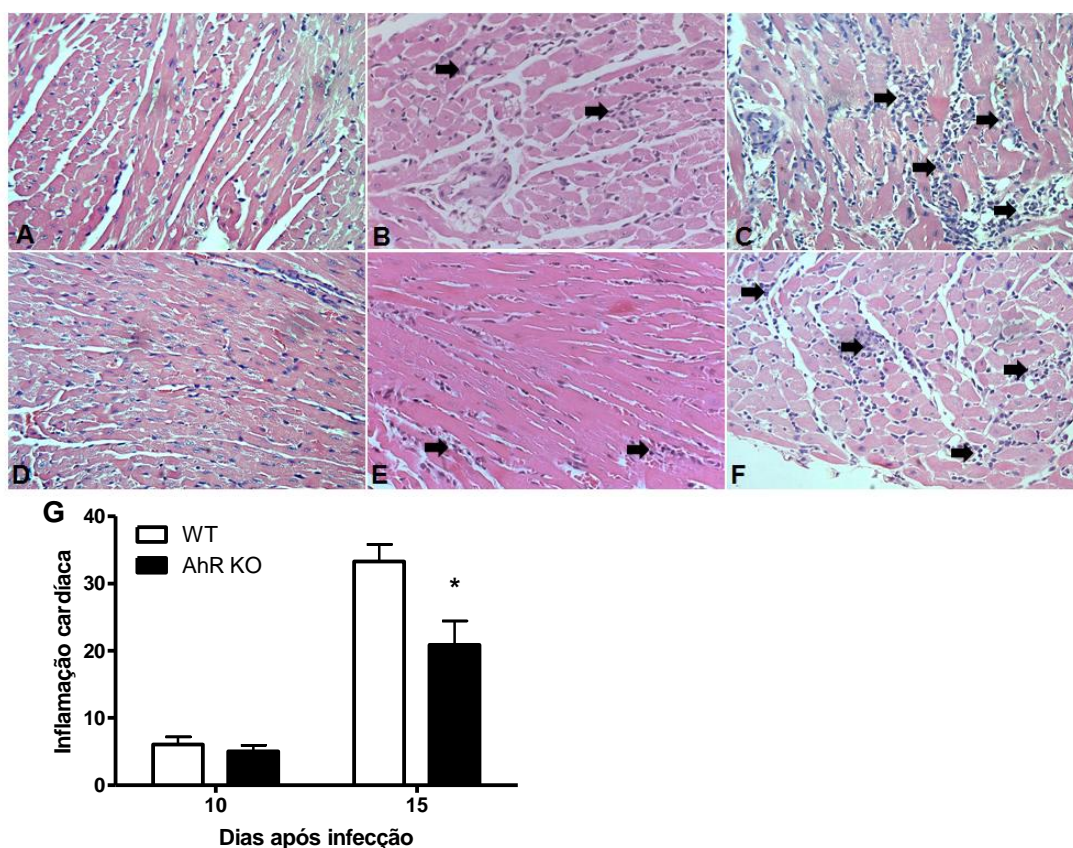
Ademais, avaliamos os níveis de mRNA de outras citocinas relevantes como IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-10, assim como o fator de transcrição Foxp3 e SOCS1, SOCS2, e SOCS3 aos 10 e 15 dpi. Não observamos diferença nos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  entre animais KO e WT (**Figura 5A e 5B**). Por outro lado, os níveis de IL-17 apresentaram-se aumentados nos braços dos animais AhR KO aos 10 dpi (**Figura 5C**). A expressão de Foxp3 (**Figura 5D**), marcador de células T reguladoras (Treg), foi maior nos animais deficientes de AhR aos 15 dpi, enquanto os níveis de IL-10 nesses animais foram menores no mesmo ponto da infecção (**Figura 5E**). Nossas análises também demonstraram que os níveis de SOCS1, SOCS2 e SOCS3 foram maiores nos animais AhR KO infectados quando comparados ao WT nas mesmas condições (**Figuras 5F, 5G e 5H**).



**Figura 5. Perfil de citocinas e SOCS no baço de camundongos AhR KO e WT infectados por *T. cruzi*.** Camundongos WT e AhR KO foram infectados por via peritoneal (íp) com  $1 \times 10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Os baços foram processados para extração do RNA total e os níveis de mRNA para (A) IL-6, (B) TNF- $\alpha$ , (C) IL-17A, (D) Foxp3, (E) IL-10, (F) SOCS1, (G) SOCS2 e (H) SOCS3 foram quantificados aos 10 e 15 dias após infecção (dpi) por qPCR. O método utilizado para análise foi o  $\Delta\Delta C_t$  e os dados foram representado como  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . As análises estatísticas foram feitas entre WT versus AhR KO  $***P < 0,001$ ,  $**P < 0,01$ ,  $*P < 0,05$ . Dados apresentados como média e  $\pm$  SEM de dois experimentos independentes.

## 5- A indução da inflamação cardíaca por *T. cruzi* é reduzida na ausência de AhR.

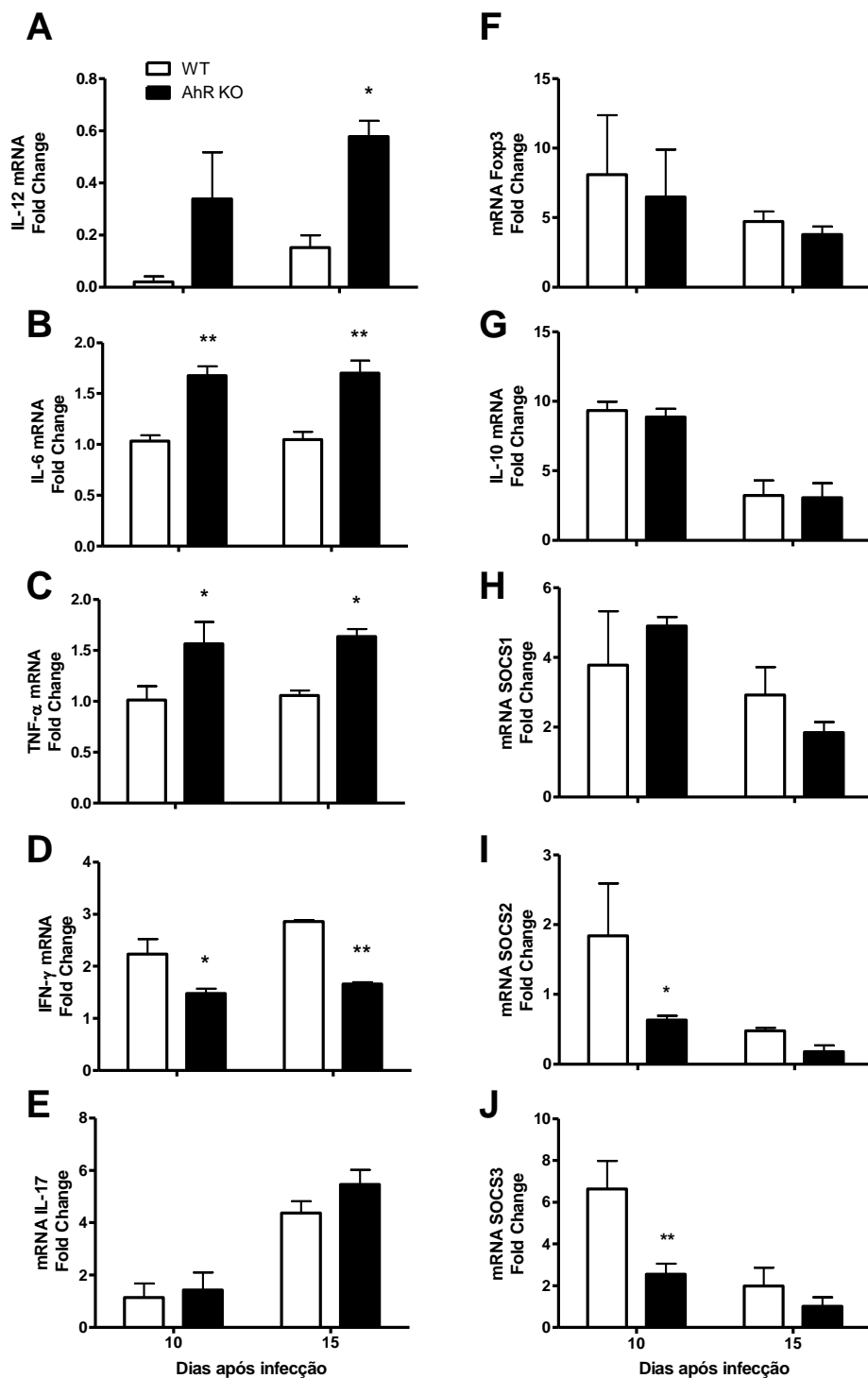
Observamos que a infecção por *T. cruzi* induziu fracamente o infiltrado inflamatório aos 10 dpi em camundongos AhR KO (**Figuras 6B, 6E e 6G**). De forma interessante, a quantidade de células inflamatórias frente a infecção aumentou com maior intensidade nos camundongos WT aos 15 dpi, do que nos AhR KO. (**Figuras 6C, 6F e 6G**).



**Figura 6. Ausência de AhR resulta em redução de células inflamatórias no coração de camundongos infectados por *T. cruzi*.** Seções marcadas por H&E representativas dos corações de camundongos, (A) WT e (D) AhR KO, não infectados. (B e C) WT e (E e F) AhR KO infectados por *T. cruzi*. (A, D) representam aparência histológica normal dos animais não infectados. Aos 10 dias após infecção (dpi) (B, E) encontramos discretos infiltrados multifocais de células imunes no miocárdio em ambos os grupos (setas). Aos 15 dpi observamos uma coalescência multifocal e intenso infiltrado inflamatório no miocárdio (setas). (F) Miocardite multifocal e moderada. Magnitude original: A-F: x400. (G) O escore inflamatório foi feito pela contagem do número total de células inflamatórias em 30 campos por camundongo sendo um total de 5 camundongos por grupo. As análises estatísticas foram feitas entre WT versus AhR KO. Dados representados como média e desvio padrão +/- SEM. \* $P < 0,05$



Para caracterizarmos melhor o perfil inflamatório no coração dos camundongos estudados, analisamos os níveis de mRNA das citocinas pró inflamatórias IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17; da citocina anti-inflamatória IL-10, do fator de transcrição Foxp3, e das proteínas reguladoras de citocinas SOCS1, SOCS2 e SOCS3. Nossos resultados mostraram que os níveis de mRNA das citocinas pró inflamatórias IL-12 (**Figure 7A**), IL-6 (**Figure 7B**) TNF- $\alpha$  (**Figure 7C**) foram maiores nos corações dos camundongos AhR KO infectados aos 15 dpi. Interessante que a quantidade de IFN- $\gamma$  foi notavelmente menor nos animais AhR KO quando comparado aos WT (**Figure 7D**). Não encontramos diferenças nos níveis de mRNA de IL-17, Foxp3 e IL-10 (**Figures 7E-G**). No que diz respeito à expressão de SOCS no coração dos animais deficientes de AhR, encontramos reduzidos níveis na expressão de SOCS2 e SOCS3, mas não de SOCS1 (**Figuras 7H-J**), aos 10 dpi em comparação aos WT também infectados.



**Figura 8. Perfil de citocinas no coração de camundongos WT e AhR KO infectados por *T. cruzi*.** Camundongos WT e AhR KO foram infectados com  $10^3$  formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Os corações foram processados e processados para extração de RNA total. Os níveis de (A) IL-12, (B) IL-6, (C) TNF- $\alpha$ , (D) IFN- $\gamma$ , e (E) IL-17A, (F) Foxp3, (G) IL-10, (H) SOCS1, (I) SOCS2 e (J) SOCS3 foram medidos aos 10 e 15 dias após infecção (dpi). (A, D) foram analisados por RT-PCR e (B-C, E-J) por qPCR. As análises de qPCR foram feitas pelo método de  $\Delta\Delta C_t$ . \*\*\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,01$ , \* $P < 0,05$ . Os dados foram representados como média e desvio padrão  $\pm$  SEM e são representativos de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas entre WT versus AhR KO

## DISCUSSÃO

. Sabemos que AhR é amplamente expresso em diversas células do corpo, incluindo as células do sistema imune. O receptor está presente no baço, linfonodos, pulmão, pele e intestino (Stockinger *et al.*, 2014). AhR é crucial para muitas funções do sistema imune, tanto para as fisiológicas naturais, quanto nos contextos de autoimunidade e de infecções (Shi *et al.*, 2007; Quintana *et al.*, 2008; Elizondo *et al.*, 2011; Quintana e Sherr, 2013; Brant *et al.*, 2014). No entanto, até o momento, ainda é desconhecida a maneira como o AhR regula a resposta imune ao longo da infecção por *T. cruzi*

Inicialmente, demonstramos que a expressão de mRNA mensageiro de AhR é regulado positivamente no baço e no coração de camundongos WT infectados por *T. cruzi*. Isso sugere que este fator de transcrição deve exercer funções importantes durante esta infecção. Já foi descrito que AhR pode ser expresso e ativado em diversas células do coração durante a embriogênese cardíaca, e na fase adulta de camundongos (Carreira *et al.*, 2015). Esse aumento observado durante a infecção por *T. cruzi*, pode ser explicado pelo aumento do infiltrado inflamatório observado nesse tecido, e/ou por uma expressão relacionada a infecção dos cardiomiócitos.

Outra evidência da relevância desse receptor, no contexto da infecção aqui abordada, é o acentuado controle da parasitemia exercido pelo sistema imune dos camundongos deficientes de AhR quando comparado aos WT. Poderíamos questionar se esse efeito estaria associado com a habilidade das células do AhR KO produzirem grandes quantidades de NO, uma molécula importante para a sinalização envolvida com a eliminação do parasita (Machado *et al.*, 2000). Entretanto, nossos resultados

demonstraram que NO não está envolvido com esse mecanismo uma vez que não encontramos diferença nas concentrações desta molécula, no soro e no baço, nos pontos da infecção que corresponderiam a sua atividade no controle da parasitemia.

Outra possível explicação para a redução da parasitemia na ausência de AhR é a produção das ROS com um conseqüente aumento nos níveis de ONOO<sup>-</sup>. É bem estabelecido que as ROS agem em células do sistema imune como mediadores para eliminar patógenos intracelulares, e que isso está associado com os mecanismos antioxidantes na tentativa de não acarretar em dano celular (Paiva e Bozza, 2014).

Apesar dos níveis de NO não explicarem a redução da parasitemia nos camundongos deficientes de AhR, os níveis aumentados de ROS, mas não de ONOO<sup>-</sup>, podem indicar que esse composto pode ser um contribuinte, em conjunto com as citocinas, para acentuar a resolução da infecção observada nos animais AhR KO ainda na fase inicial. Embora tenha ocorrido um aumento na quantidade de ROS produzido no baço durante a infecção por *T. cruzi*, nossos dados de infecção *in vitro*, demonstraram que a produção de ROS por macrófagos é fortemente comprometida na ausência de AhR. Tal fenótipo era esperado uma vez que já havia sido descrito que AhR contribui significativamente para a produção de ROS (Denison *et al.*, 2011), e principalmente para uma espécie específica, o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Senft *et al.*, 2002). Nossa constatação de que *T. cruzi* apresenta uma deficiência para se replicar dentro dos macrófagos deficientes de AhR, poderia ser explicada pela evidência existente sobre a importância de ROS como um fator que dá suporte ao crescimento intracelular de *T. cruzi* (Paiva *et al.*, 2012; Menna-Barreto e De Castro, 2014). Portanto, isso explicaria a limitação da replicação do parasita observada nos macrófagos deficientes de AhR.

Dessa forma ROS poderia ter papéis ambíguos que estariam provavelmente relacionados com a concentração e localização (tecido/células) em que seriam

produzidos (Menna-Barreto e De Castro, 2014). Além disso, nossos resultados demonstraram que a ativação de macrófagos com zymosan, um composto comumente utilizado em modelos pro inflamatórios de ativação de macrófagos, induziu ROS de forma parcialmente dependente de AhR, demonstrando que esse receptor é importante para modular a produção de ROS por macrófagos frente a diferentes estímulos.

A ausência de AhR também foi relacionada ao aumento da produção de IL-12 por células dendríticas e macrófagos, IFN- $\gamma$  por células CD4+ e CD8+ e IL-17 por esplenócitos aos 10 dpi, resultando em uma resposta inflamatória precoce quando comparado ao WT. A redução da expressão de IL-17 observada nos camundongos AhR KO aos 15 dpi poderia estar relacionada com o aumento da expressão de Foxp3, e não com a de IL-10, neste ponto da infecção, refletindo, possivelmente um aumento da população de células Treg. As células Treg são descritas como reguladoras da função celular pela secreção de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$ , ou pelo contato direto com receptores de superfície expressos em células alvo (Cua e Tato, 2010). Esses dados corroboram a ideia de que a ativação de AhR leva a supressão da inflamação. Durante a colite experimental essa supressão ocorre pela regulação gênica de FoxP3 e IL-17. Na malária cerebral experimental os camundongos deficientes de AhR também apresentaram aumento dos níveis de IL-17 no cérebro associado com a redução da expressão de SOCS1 e SOCS3 (Singh *et al.*, 2011; Brant *et al.*, 2014). No nosso estudo, SOCS1 e SOCS3 foram regulados positivamente aos 15 dpi, o que pode estar associado à redução da expressão de IL-17, assim como foi previamente descrito por (Wormald *et al.*, 2006)

Como o coração é o principal órgão afetado pelo *T. cruzi*, o que altera função e resulta em patologia, avaliamos o papel de AhR na geração do infiltrado inflamatório característico em camundongos infectados por esse parasita. Não houve diferença na

quantidade de células inflamatórias aos 10 dpi, contudo aos 15 dpi os camundongos deficientes de AhR apresentaram número reduzido de células inflamatórias no miocárdio quando comparado aos WT nas mesmas condições. Todavia, a expressão de mRNA de algumas citocinas inflamatórias (IL-12, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) foi maior no coração dos camundongos AhR KO infectados, associado com a redução de SOCS2 e SOCS3. A partir desses resultados, podemos inferir que apesar de AhR KO apresentar número reduzido de células inflamatórias, as células residentes e/ou recrutadas, são mais responsivas do que as do WT. Por outro lado, os níveis reduzidos de IFN- $\gamma$  observados nos camundongos deficientes de AhR, em ambos os tempos, pode provavelmente estar associado com a redução da migração de células T para o miocárdio e/ou redução na capacidade dessas células de produzir IFN- $\gamma$  na ausência de AhR. A redução da expressão de IFN- $\gamma$ , poderia também explicar a expressão reduzida de mRNA de SOCS3 encontrada no miocárdio dos camundongos deficientes infectados por *T. cruzi*.

Anteriormente, demonstramos que AhR participa da indução de SOCS2 por lipoxinas em células dendríticas (Machado *et al.*, 2006), e que a deficiência de SOCS2 resulta em disfunção cardíaca durante a infecção experimental por *T. cruzi* (Esper *et al.*, 2012). Nesse trabalho, nossos resultados demonstram que camundongos deficientes de AhR tiveram uma redução significativa de SOCS2 no coração durante a infecção por *T. cruzi*. Em resumo, nosso estudo demonstra a importância de AhR na infecção experimental por *T. cruzi*, o que destaca que a ausência de AhR resulta em aumento da resistência, resposta imune antecipada, menor inflamação cardíaca *in vivo* ao custo da redução de SOCS2 no coração, o que foi recentemente provado de ser crucial para a proteção/função do miocárdio durante a infecção por *T. cruzi* (Machado *et al.*, 2006; Esper *et al.*, 2012). A modulação da síntese de ROS *in vivo* e *in vitro*, demonstra que esse composto desempenha seu papel de maneira dependente da concentração e do local

durante a infecção por *T. cruzi* (Kimura *et al.*, 2014; Menna-Barreto e De Castro, 2014). Sendo assim, nosso trabalho fornece indícios sobre o papel de AhR na modulação da resposta imune e produção de ROS durante a infecção experimental por *T. cruzi*. Ainda sugere que, AhR, originalmente associado com a resposta à dioxina, poderia ser um alvo direto para a modulação da resposta imune e desenvolvimento de patologia na doença de Chagas, de fato medicamentos existentes atuam pela formação de radicais livres os quais já sabemos que podem ser diretamente regulados por este receptor.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

*“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa, por isso aprendemos sempre.”*

Paulo Freire

*"Stay hungry. Stay foolish."*

Stewart Brand



O objetivo proposto no início do trabalho foi alcançado, mas o mecanismo molecular pelo qual AhR influencia a produção de ROS, e como interfere na infecção por *T. cruzi*, ainda pode ser melhor elucidado. Outros dados foram produzidos, mas não foram demonstrados uma vez que ainda são inconclusivos, não se encaixavam no contexto apresentado e/ou precisam de replicatas experimentais. O fator limitante para a realização do projeto foi a disponibilidade de camundongos AhR, principalmente para experimentos *in vivo* que demandam um número maior de animais, uma vez que, como descrito por (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995), quase metade dos camundongos deficientes de AhR morrem após o nascimento.

## CONCLUSÕES

*“What you do for yourself dies with you when you leave this world, what you do for others live on forever.”*

Ken Robinson

Produzimos dados consistentes que indicam a importante participação de AhR ao longo do curso da infecção por *T. cruzi* sendo eles: (i) AhR é regulado positivamente no coração de camundongos WT infectados por *T. cruzi*; (ii) a deficiência de AhR conferiu resistência a infecção por *T. cruzi in vivo*; (iii) A deficiência de AhR resultou em um aumento no estresse oxidativo em macrófagos esplênicos, e em uma resposta pro-inflamatória potente; (iv) em contraste, a ausência de AhR, em macrófagos peritoniais, levou ao aumento da atividade tripanocida, *in vitro*, apesar da redução da produção de ROS e não alteração na produção de NO; (v) durante a infecção, na ausência de AhR o dano cardíaco, medido pela histopatologia e pela quantificação do infiltrado inflamatório, foi menor quando comparado ao grupo WT também infectado. Isso está associado com uma resposta imune robusta e efetiva dos camundongos AhR KO infectados, apesar da redução do infiltrado inflamatório.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, M. F. et al. Selective inhibition of polymorphonuclear neutrophil activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 101, n. 3, p. 470-80, Dec 1989. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2557688> >.

ALBERTTI, L. A. et al. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in Trypanosoma cruzi invasion and intracellular development. **Microbes Infect**, v. 12, n. 10, p. 784-9, Sep 2010. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20561595> >.

ALEXANDER, W. S.; HILTON, D. J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 503-29, 2004. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032587> >.

ALIBERTI, J. C. et al. Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect Immun**, v. 64, n. 6, p. 1961-7, Jun 1996. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8675294> >.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 819-23, Oct 2005. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16175174> >.

ARAÚJO, A. et al. Paleoparasitology of Chagas disease--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 9-16, Jul 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753453> >.

AUFDERHEIDE, A. C. et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 7, p. 2034-9, Feb 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14766963> >.

BECERRA, M. C. et al. In vitro activity of N-benzenesulfonylbenzotriazole on Trypanosoma cruzi epimastigote and trypomastigote forms. **Exp Parasitol**, v. 131, n. 1, p. 57-62, May 2012. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22425748> >.

BERMEJO, D. A. et al. Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR $\gamma$ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. **Nat Immunol**, v. 14, n. 5, p. 514-22, May 2013. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563688> >.

BERMÚDEZ DE LEÓN, M. et al. Beta-naphthoflavone represses dystrophin Dp71 expression in hepatic cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1759, n. 3-4, p. 152-8, 2006 Mar-Apr 2006. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730384> >.

BOVERHOF, D. R. et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces suppressor of cytokine signaling 2 in murine B cells. **Mol Pharmacol**, v. 66, n. 6, p. 1662-70, Dec 2004. ISSN 0026-895X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15371557> >.

BRANT, F. et al. Immune response profile and development of pathology during Plasmodium berghei Anka infection: the role of the aryl hydrocarbon receptor (AhR). **Infect Immun**, May 2014. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24818665> >.

BRIONES, M. R. et al. The evolution of two Trypanosoma cruzi subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Mol Biochem Parasitol**, v. 104, n. 2, p. 219-32, Nov 1999. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10593177> >.

CAMACHO, I. A.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. S. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces Fas-dependent activation-induced cell death in superantigen-primed T cells. **Arch Toxicol**, v. 76, n. 10, p. 570-80, Oct 2002. ISSN 0340-5761. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12373453> >.

CARDILLO, F. et al. Regulation of Trypanosoma cruzi infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect Immun**, v. 64, n. 1, p. 128-34, Jan 1996. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8557330> >.

CARREIRA, V. S. et al. Disruption of Ah Receptor Signaling during Mouse Development Leads to Abnormal Cardiac Structure and Function in the Adult. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0142440, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26555816> >.

CHAGAS, C. **Nova Tripanosomíaze Humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de uma nova entidade mórbida do homem.**: Mem. Inst. Oswaldo Cruz: 159-218 p. 1909.

CHOI, Y. Role of TRAF6 in the immune system. **Adv Exp Med Biol**, v. 560, p. 77-82, 2005. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15932023> >.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. D. **A critical review on Chagas disease chemotherapy.** Rio de Janeiro: Mem Inst Oswaldo Cruz. 97: 3-24 p. 2002.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 31-40, Jul 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753455> >.

CUA, D. J.; TATO, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 7, p. 479-89, Jul 2010. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20559326> >.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-8884. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811486> >.

DELGADO-ORTEGA, M. et al. SOCS proteins in infectious diseases of mammals. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 151, n. 1-2, p. 1-19, Jan 2013. ISSN 1873-2534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23219158> >.

DENISON, M. S.; FISHER, J. M.; WHITLOCK, J. P. Inducible, receptor-dependent protein-DNA interactions at a dioxin-responsive transcriptional enhancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 8, p. 2528-32, Apr 1988a. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2833743> >.

DENISON, M. S. et al. The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. **J Biol Chem**, v. 263, n. 33, p. 17221-4, Nov 1988b. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2846558> >.

DENISON, M. S. et al. Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. **Toxicol Sci**, v. 124, n. 1, p. 1-22, Nov 2011. ISSN 1096-0929. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21908767> >.

DIAS, J. C. [Globalization, inequity and Chagas disease]. **Cad Saude Publica**, v. 23 Suppl 1, p. S13-22, 2007. ISSN 0102-311X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17308713> >.

DIAS, J. C.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 603-12, Jul 2002. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12219120> >.

DIAS, L. C. E. A. **Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos.**: Quimica Nova. 32: 2444-1457 p. 2009.

DONG, L.; MA, Q.; WHITLOCK, J. P. Down-regulation of major histocompatibility complex Q1b gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **J Biol Chem**, v. 272, n. 47, p. 29614-9, Nov 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9368027> >.

DOOLEY, R. K.; HOLSAPPLE, M. P. Elucidation of cellular targets responsible for tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced suppression of antibody responses: I. The role of the B lymphocyte. **Immunopharmacology**, v. 16, n. 3, p. 167-80, 1988 Nov-Dec 1988. ISSN 0162-3109. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3267010> >.

ELIZONDO, G. et al. Deletion of the aryl hydrocarbon receptor enhances the inflammatory response to Leishmania major infection. **Int J Biol Sci**, v. 7, n. 9, p. 1220-9, 2011. ISSN 1449-2288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22110376> >.

ESPER, L. et al. Role of SOCS2 in modulating heart damage and function in a murine model of acute Chagas disease. **Am J Pathol**, v. 181, n. 1, p. 130-40, Jul 2012. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22658486> >.

FABRINO, D. L. et al. Rat models to investigate host macrophage defense against Trypanosoma cruzi. **J Innate Immun**, v. 3, n. 1, p. 71-82, 2011. ISSN 1662-8128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21051863> >.

FAULKNER, K.; FRIDOVICH, I. Luminol and lucigenin as detectors for O<sub>2</sub>·-. **Free Radic Biol Med**, v. 15, n. 4, p. 447-51, Oct 1993. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8225026> >.

FERNANDEZ-SALGUERO, P. et al. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. **Science**, v. 268, n. 5211, p. 722-6, May 1995. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7732381> >.

FRANCO-PAREDES, C. et al. Chagas disease: an impediment in achieving the Millennium Development Goals in Latin America. **BMC Int Health Hum Rights**, v. 7, p. 7, 2007. ISSN 1472-698X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17725836> >.

FUNATAKE, C. J. et al. Expression of constitutively-active aryl hydrocarbon receptor in T-cells enhances the down-regulation of CD62L, but does not alter expression of CD25 or suppress the allogeneic CTL response. **J Immunotoxicol**, v. 6, n. 3, p. 194-203, Sep 2009. ISSN 1547-6901. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635034> >.

FUNATAKE, C. J. et al. Early consequences of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on the activation and survival of antigen-specific T cells. **Toxicol Sci**, v. 82, n. 1, p. 129-42, Nov 2004. ISSN 1096-6080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15310856> >.

FUNATAKE, C. J. et al. Cutting edge: activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin generates a population of CD4+ CD25+ cells with characteristics of regulatory T cells. **J Immunol**, v. 175, n. 7, p. 4184-8, Oct 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177056> >.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-61, Feb 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20133564> >.

GILLIAM, M. B. et al. A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by *Aspergillus* nitrate reductase. **Anal Biochem**, v. 212, n. 2, p. 359-65, Aug 1993. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8214577> >.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, n. 1, p. 131-8, Oct 1982. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7181105> >.

HADDAD, I. Y. et al. Concurrent generation of nitric oxide and superoxide damages surfactant protein A. **Am J Physiol**, v. 267, n. 3 Pt 1, p. L242-9, Sep 1994. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7943250> >.

HAHN, M. E. et al. Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 25, p. 13743-8, Dec 1997. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9391097> >.

HEUMÜLLER, S. et al. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 211-7, Feb 2008. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18086956> >.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 524 p. 2008.

KILE, B. T. et al. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. **Trends Biochem Sci**, v. 27, n. 5, p. 235-41, May 2002. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12076535> >.

KIM, Y. C. et al. Thioredoxin-dependent redox regulation of the antioxidant responsive element (ARE) in electrophile response. **Oncogene**, v. 22, n. 12, p. 1860-5, Mar 2003. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660821> >.

KIMURA, A. et al. Aryl hydrocarbon receptor protects against bacterial infection by promoting macrophage survival and reactive oxygen species production. **Int Immunol**, v. 26, n. 4, p. 209-20, Apr 2014. ISSN 1460-2377. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24343818> >.

KIMURA, A. et al. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 28, p. 9721-6, Jul 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18607004> >.

KOJIMA, H. et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluoresceins. **Anal Chem**, v. 70, n. 13, p. 2446-53, Jul 1998. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9666719> >.

KOOY, N. W. et al. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. **Free Radic Biol Med**, v. 16, n. 2, p. 149-56, Feb 1994. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8005510> >.

LAHVIS, G. P. et al. Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 19, p. 10442-7, Sep 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973493> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print) 1046-2023 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

MACHADO, F. S. et al. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. **Nat Med**, v. 12, n. 3, p. 330-4, Mar 2006. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16415877> >.

MACHADO, F. S. et al. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v. 102, n. 24, p. 3003-8, Dec 2000. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113053> >.

MARCHAND, A.; BAROUKI, R.; GARLATTI, M. Regulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression by CYP1A1 activity. **Mol Pharmacol**, v. 65, n. 4, p. 1029-37, Apr 2004. ISSN 0026-895X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044633> >.

MARTEY, C. A. et al. The aryl hydrocarbon receptor is a regulator of cigarette smoke induction of the cyclooxygenase and prostaglandin pathways in human lung fibroblasts. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 289, n. 3, p. L391-9, Sep 2005. ISSN 1040-0605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863442> >.

MEJIA, A. M. et al. Benzimidazole-resistance in Trypanosoma cruzi is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. **J Infect Dis**, v. 206, n. 2, p. 220-8, Jul 2012. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22551809> >.



MENNA-BARRETO, R. F.; DE CASTRO, S. L. The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 614014, 2014. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24800243> >.

N'DIAYE, M. et al. Aryl hydrocarbon receptor- and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo[a]pyrene. **J Biol Chem**, v. 281, n. 29, p. 19906-15, Jul 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16679317> >.

NEUBERT, R. et al. Chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and the human immune system. 1. Blood cell receptors in volunteers with moderately increased body burdens. **Life Sci**, v. 53, n. 26, p. 1995-2006, 1993. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8255162> >.

NISHIMURA, N. et al. Altered thyroxin and retinoid metabolic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in aryl hydrocarbon receptor-null mice. **Arch Toxicol**, v. 79, n. 5, p. 260-7, May 2005. ISSN 0340-5761. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15902423> >.

NOHARA, K. et al. Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed specifically in T-lineage cells causes thymus involution and suppresses the immunization-induced increase in splenocytes. **J Immunol**, v. 174, n. 5, p. 2770-7, Mar 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728486> >.

OESCH-BARTLOMOWICZ, B. et al. Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 26, p. 9218-23, Jun 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972329> >.

OYAMA, Y. et al. Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. **Brain Res**, v. 635, n. 1-2, p. 113-7, Jan 1994. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8173945> >.

PAIVA, C. N.; BOZZA, M. T. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 6, p. 1000-37, Feb 2014. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23992156> >.

PAIVA, C. N. et al. Oxidative stress fuels Trypanosoma cruzi infection in mice. **J Clin Invest**, v. 122, n. 7, p. 2531-42, Jul 2012. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22728935> >.

PETRULIS, J. R. et al. The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. **J Biol Chem**, v. 278, n. 4, p. 2677-85, Jan 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12431985> >.

POLAND, A. et al. Photoaffinity labeling of the Ah receptor. **J Biol Chem**, v. 261, n. 14, p. 6352-65, May 1986. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3009454> >.

POLAND, A.; GLOVER, E.; KENDE, A. S. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. **J Biol Chem**, v. 251, n. 16, p. 4936-46, Aug 1976. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/956169> >.

POLAND, A. P. et al. Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity. Induction of monooxygenase activities and cytochrome P1-450 formation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice genetically "nonresponsive" to other aromatic hydrocarbons. **J Biol Chem**, v. 249, n. 17, p. 5599-606, Sep 1974. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4370044> >.

PUNUKOLLU, G. et al. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **Int J Cardiol**, v. 115, n. 3, p. 279-83, Feb 2007. ISSN 1874-1754. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16769134> >.

QUINTANA, F. J. The aryl hydrocarbon receptor: a molecular pathway for the environmental control of the immune response. **Immunology**, v. 138, n. 3, p. 183-9, Mar 2013. ISSN 1365-2567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190340> >.

QUINTANA, F. J. et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, v. 453, n. 7191, p. 65-71, May 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18362915> >.

QUINTANA, F. J.; SHERR, D. H. Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity. **Pharmacol Rev**, v. 65, n. 4, p. 1148-61, Oct 2013. ISSN 1521-0081. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23908379> >.

REED, S. G. et al. IL-10 mediates susceptibility to Trypanosoma cruzi infection. **J Immunol**, v. 153, n. 7, p. 3135-40, Oct 1994. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8089491> >.

ROBBINS, C. S.; SWIRSKI, F. K. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 16, p. 2685-93, Aug 2010. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20437077> >.

SCHALDACH, C. M.; RIBY, J.; BJELDANES, L. F. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. **Biochemistry**, v. 38, n. 23, p. 7594-600, Jun 1999. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10360957> >.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc**, v. 3, n. 6, p. 1101-8, 2008. ISSN 1750-2799 (Electronic) 1750-2799 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18546601> >.

SENFT, A. P. et al. Mitochondrial reactive oxygen production is dependent on the aromatic hydrocarbon receptor. **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 9, p. 1268-78, Nov 2002. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12398935> >.

SHEPHERD, D. M. et al. Anti-CD40 Treatment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-exposed C57Bl/6 mice induces activation of antigen presenting cells yet fails to overcome TCDD-induced suppression of allograft immunity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 170, n. 1, p. 10-22, Jan 2001. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11141351> >.

SHI, L. Z. et al. The aryl hydrocarbon receptor is required for optimal resistance to *Listeria monocytogenes* infection in mice. **J Immunol**, v. 179, n. 10, p. 6952-62, Nov 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982086> >.

SILVA, J. S.; MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Front Biosci**, v. 8, p. s314-25, May 2003. ISSN 1093-4715. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12877141> >.

SILVA, J. S. et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Exp Med**, v. 175, n. 1, p. 169-74, Jan 1992. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1730915> >.

SINGH, N. P.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. Primary peripheral T cells become susceptible to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated apoptosis in vitro upon activation and in the presence of dendritic cells. **Mol Pharmacol**, v. 73, n. 6, p. 1722-35, Jun 2008. ISSN 1521-0111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18334599> >.

SINGH, N. P. et al. Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) leads to reciprocal epigenetic regulation of FoxP3 and IL-17 expression and amelioration of experimental colitis. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23522, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21858153> >.

SONG, J. et al. A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 23, p. 14694-9, Nov 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12409613> >.

STEJSKALOVA, L.; DVORAK, Z.; PAVEK, P. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. **Curr Drug Metab**, v. 12, n. 2, p. 198-212, Feb 2011. ISSN 1875-5453. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21395538> >.

STOCKINGER, B. et al. The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. **Annu Rev Immunol**, v. 32, p. 403-32, 2014. ISSN 1545-3278. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24655296> >.

TACKE, F.; RANDOLPH, G. J. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. **Immunobiology**, v. 211, n. 6-8, p. 609-18, 2006. ISSN 0171-2985. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920499> >.

TANOWITZ, H. B. et al. Chagas' disease. **Clin Microbiol Rev**, v. 5, n. 4, p. 400-19, Oct 1992. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1423218> >.

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 4, p. 430-4, Aug 2007. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17651955> >.

TEIXEIRA, A. R. et al. Chagas disease. **Postgrad Med J**, v. 82, n. 974, p. 788-98, Dec 2006. ISSN 1469-0756. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17148699> >.

TESTON, A. P. et al. In vivo susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. **Trop Med Int Health**, v. 18, n. 1, p. 85-95, Jan 2013. ISSN 1365-3156. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23130989> >.

TONN, T. et al. Persistence of decreased T-helper cell function in industrial workers 20 years after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Environ Health Perspect**, v. 104, n. 4, p. 422-6, Apr 1996. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8732953> >.

TORRICO, F. et al. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J Immunol**, v. 146, n. 10, p. 3626-32, May 1991. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1902858> >.

UNDERHILL, D. M. Macrophage recognition of zymosan particles. **J Endotoxin Res**, v. 9, n. 3, p. 176-80, 2003. ISSN 0968-0519. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12831459> >.

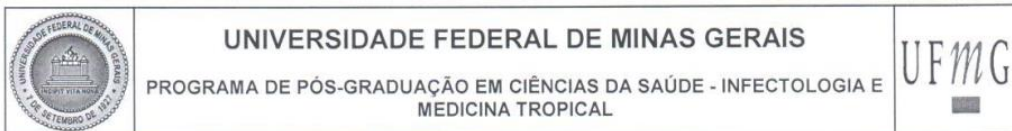
VECCHI, A. et al. The effect of acute administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on humoral antibody production and cell-mediated activities in mice. **Arch Toxicol Suppl**, v. 4, p. 163-5, 1980. ISSN 0171-9750. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6933896> >.

VELDHOEN, M. et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. **Nature**, v. 453, n. 7191, p. 106-9, May 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18362914> >.

WHO, W. H. O. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2014. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> >. Acesso em: July 27th, 2014.

WORMALD, S. et al. The comparative roles of suppressor of cytokine signaling-1 and -3 in the inhibition and desensitization of cytokine signaling. **J Biol Chem**, v. 281, n. 16, p. 11135-43, Apr 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473883> >.

## **ANEXO 1 – Ata da defesa**



## ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA ANDREIA BARROSO GONÇALVES

Realizou-se, no dia 13 de agosto de 2014, às 14:00 horas, Sala 824, 8º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada **PAPEL DO RECEPTOR ARIL HIDROCARBONO (AhR) DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma cruzi***, apresentada por **ANDREIA BARROSO GONÇALVES**, número de registro 2013708151, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/NOTURNO, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, à seguinte Comissão Examinadora: Profª. Fabiana Simão Machado - Orientadora (UFMG), Profª. Vanessa Pinho da Silva - Coorientadora (UFMG), Profª. Santuza Maria Ribeiro Teixeira (UFMG), Prof. Flávio Almeida Amaral (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:


Aprovada

Reprovada

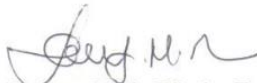
Finalizados os trabalhos, foi lavrada a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.  
Belo Horizonte, 13 de agosto de 2014.



Profª. Fabiana Simão Machado ( Doutora )



Profª. Vanessa Pinho da Silva ( Doutora )



Profª. Santuza Maria Ribeiro Teixeira ( Doutora )



Prof. Flávio Almeida Amaral ( Doutor )

## **ANEXO I1 – Folha de aprovação**

**Via da Aluna**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E  
MEDICINA TROPICAL

UFMG

## FOLHA DE APROVAÇÃO

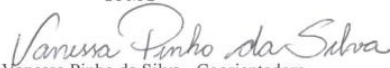
**PAPEL DO RECEPTOR ARIL HIDROCARBONO (AhR) DURANTE A INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL POR Trypanosoma cruzi****ANDREIA BARROSO GONÇALVES**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, área de concentração INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

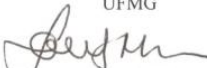
Aprovada em 13 de agosto de 2014, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Fabiana Simão Machado - Orientadora  
UFMG



Prof. Vanessa Pinho da Silva - Coorientadora  
UFMG



Prof. Santuza Maria Ribeiro Teixeira  
UFMG



Prof. Flávio Almeida Amaral  
UFMG

Belo Horizonte, 13 de agosto de 2014.



## **APÊNDICE - Artigo científico**

**Role of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) in the modulation of  
immune response and reactive oxygen species production during  
*Trypanosoma cruzi* infection**

**Andréia Barroso,<sup>•\*</sup> Melisa Gualdrón-López\*, Lísia Esper,<sup>•\*</sup> Fátima Brant,<sup>•\*</sup>  
Ronan R. S. Araújo,\* Matheus B. H. Carneiro,\* Thiago V. Ávila,<sup>#</sup> Danielle G.  
Souza,<sup>‡#</sup> Vanessa Pinho,<sup>±</sup> Leda Q. Vieira,\* Milene A. Rachid,<sup>§</sup> Mauro M.  
Teixeira,<sup>•\*#</sup> Fabiana S. Machado<sup>•\*</sup>**

From the Program in Health Sciences: Infectious Diseases and Tropical Medicine<sup>•</sup>  
Medical School, and Departments of Biochemistry and Immunology,\* and Physiology  
and Pharmacology,<sup>#</sup> and Microbiology,<sup>‡</sup> and Morphology,<sup>±</sup> and Pathology,<sup>§</sup> Institute of  
Biological Science, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil;

**Major article**

**ABSTRACT**

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a known ligand-activated transcription factor that has been described as a potential target for therapeutic interventions. Upon *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium berghei* ANKA infection, absence of AhR results in central nervous system dysfunction. However, its role in *T. cruzi* infection has not been explored. *T. cruzi* is a parasite that causes Chagas disease, an important neglected illness. Herein, we demonstrated that AhR is modulated during *T. cruzi* infection in spleen and heart and its deficiency results in higher resistance, an anticipate immune response and in lower heart inflammation. The AhR deficient mice resistance is probably associated with decreased levels of reactive oxygen species (ROS) resulting in inability of parasite *in vitro* to growth inside macrophages, but *in vivo*, associates with increased inflammatory cytokines and ROS production, but not with nitric oxide. This is the first report about the role of AhR in the modulation of immune response and ROS production during *T. cruzi* infection.

**Key words**

*Trypanosoma cruzi*

Aryl Hydrocarbon Receptor

Reactive Oxygen Species  
Suppressors of cytokine signaling

## **BACKGROUND**

The first clue about the existence of Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) was suggested in middle of seventh decade, when studies demonstrated that an intracellular receptor was involved in the induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity [1, 2]. Several aromatic hydrocarbons, all exogenous compounds, including 3,7,8-tetrachloroibenzo-p-dioxin (TCDD) were demonstrated as capable to induce AhR activity [3]. In fact, those compounds are still potent tools to investigate/uncover the pathways triggered/regulated by AhR [4, 5]. Besides exogenous ligands, it is currently known that human and mouse AhR has also many endogenous ligands. Molecules as indirubin, quercetin, kynurenic acid, 3-indoxyl sulfate, lipoxins, kynurenine, prostaglandins, resveratrol and others have been identified as potent ligands [6-11]

AhR is a ligand-activated transcription factor that, in absence of a ligand, forms a tetrameric complex in cytosol. Upon ligand binding, AhR translocate to the nucleus where associates with Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT), followed by interaction of this new complex with specific DNA sequences that control transcriptional activity of target genes [12]. Nevertheless, AhR-independent ligand activation has been described, but the relevance/role of this activation mechanism is uncertain [5, 13]. AhR activation is essential in the regulation of immune response, and due to the numerous physiological changes found in AhR knockout (KO) mice, plenty functions of this receptor have been discovered [5, 14-16], including an important role in normal physiology.

In the context of immunity, it was described that AhR is essential for murine resistance to *Listeria monocytogenes* [17], refrains and exacerbates development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) when stimulated with dioxin and FICZ [18], is associated with anti-viral immunity [19, 20] and is related with a better resolution during *Leishmania major* experimental infection [21]. Studies from our group demonstrated that AhR is critical for suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2 expression induced by lipoxin in dendritic cells [22]. In a mice model of *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* infection, absence of SOCS2 results in central nervous system and heart dysfunction, respectively [22, 23]. During *Plasmodium berguei* ANKA experimental infection AhR is related with the ability to control the parasite replication and interfere in inflammatory responses probably by means of SOCS1 and SOCS3 [23]. SOCS family is composed by eight proteins, commonly known as cytokine-inducible SH2-containing protein (CIS) and SOCS1-7. SOCS1-3 have been the most studied members and are associated with the suppression of cytokine actions by inhibiting Janus kinase (JAK) activities. Data obtained from SOCS1 KO mice suggest that this protein plays an important role in IFN- $\gamma$  signaling while SOCS3 has a double-edge sword function since is able to regulate proinflammatory and anti-inflammatory cytokines such as Interleukin (IL) 6 and IL-10 [24]. SOCS1 and SOCS3 are induced by the anti-inflammatory cytokine IL-10 and are regulated by SOCS2 [22]. Here we have given special attention to this member of SOCS family since we tried to address the question if AhR modulates SOCS2 expression during *T. cruzi* infection.

*T. cruzi* is a flagellate protozoan parasite that causes Chagas disease, an important neglected zoonosis which affects currently 6-7 million individuals, and besides the decreased in annual global mortality between 1990 and 2009, this disease is still responsible for more than 10,000 deaths per year [25]. The majority of infected

people undergoes acute phase to indeterminate clinical form of disease, a state of the disease than can last from years to decades [25]. Symptoms in the chronic phase are mainly related with cardiac dysfunctions that are caused by ischemia, necrosis, inflammation and chronic increase in intracavitary pressure [26]. Chagas cardiomyopathy is the main, most severe and common manifestation of disease affecting 20-40% of the infected persons [27].

It is well known that a quick immune response against *T. cruzi* infection is very important to balance the pathogen and host survival at the initial phase of disease. IFN- $\gamma$  is critical to control pathogen replication. IL-12 is essential to induce IFN- $\gamma$ -dependent innate and acquired immune response [28-31]. Natural killer (NK) cells when activated by IL-12 produce IFN- $\gamma$  resulting in an expansion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells which in turn produce further IFN- $\gamma$ . Then, IFN- $\gamma$  activates *T. cruzi*-infected macrophages to produce nitric oxide (NO) which controls pathogen-intracellular growth [32]. Together with superoxide, NO is capable to promote peroxynitrite-mediated *T. cruzi* clearance in macrophages [33, 34]. In *T. cruzi*-infected cardiac myocytes, mitochondrial-reactive oxygen species (ROS) induction results in expression of inflammatory cytokines in a NF- $\kappa$ B dependent manner [35, 36]. *In vivo* data, with *T. cruzi* SylvioX10/4 strain, suggest that activation of inflammatory cells and cytokine production in spleen by NADPH oxidase (NOX) activation and ROS production contributes to development of myocarditis and chronic fibrosis in Chagas disease [37]. When hosts were treated with apocynin (NADPH oxidase inhibitor) the defense against acute parasitemia decreased owing to reduced activation of inflammatory and oxidative process [37]. Furthermore, studies with p47phox<sup>-/-</sup> mice (which does not mobilize NADP oxidase-mediated oxidative burst to produce superoxide) corroborated the importance of redox status [26]. It was also proposed that ROS and NO reacts resulting in generation of peroxynitrite

(ONOO<sup>-</sup>), a reaction that strengthens the clearance power of NO enhancing its oxidative properties during *T. cruzi* infection [38].

Expression of persistent high levels of CYP1A1 and other related CYPs in response to TCDD and other AhR ligands, leads to increased metabolism of exogenous and endogenous chemicals and to the generation of ROS, increase in oxidative DNA damage and the direct activation of intracellular kinase signaling pathways, thus, altering, indirectly, gene expression and cellular responses. It was demonstrated that AhR-dependent CYP1A1 expression was required for this effect [4]. When produced in lower concentrations, ROS induces Nrf-2 activation, a transcription factor sensible to cell oxidative variations associated with the regulation of genes that codify antioxidant proteins like enzymes of glutathione synthesis [39, 40] tioredoxina-1[41], heme oxigenase-1[42], glutathione peroxidase, glutathione disulfide redutase [43], among others. An intermediary amount of ROS stimulates the inflammatory response via activation of NF- $\kappa$ B and activator protein (AP) 1 [44, 45], while higher concentrations of ROS induces formation of pores in the mitochondria membrane and uncouples electrons transfer thus resulting in apoptosis or necrosis [46]. In this way, the capacity oh host-derived ROS to interfere in trypanosomatids biology is still controversial since it could lead to parasite death, cell signaling or proliferation showing its double-edge sword profile [47]. The production of ROS during *T. cruzi* Y strain infection has been shown to stimulate amastigotes growth inside macrophages, and it can be associated with iron mobilization [48]. This data indicates that ROS may also be related with parasite proliferation and burden. Modulatory cytokines like IL-10 and TGF- $\beta$  inhibits IFN- $\gamma$ -dependent macrophage activation, NO production and the differentiation of IFN- $\gamma$  producing cells [49, 50]. These mechanisms are required for induction and maintenance of immune control during the acute phase of *T. cruzi* infection [28, 49].

It is known that in the context of immunity, different AhR ligands can lead to different outcomes. Treatments with nanoparticles results in suppression of autoimmunity by induction of T regulatory (Treg) cells in EAE model in a selective AhR activation-dependent manner. However, treatment with FICZ unleashes the opposite effect by inducing Th17 cells [5]., AhR has a strong potential as a therapeutic target. Herein, in the present study, we employed AhR KO mice to investigate the role of AhR in the modulation of immune response and development of myocarditis during the *T. cruzi* experimental infection.

## METHODS

**Animals:** Wild-type (WT) C57BL/6 mice, were obtained from the Animal Care Facilities of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais, Brazil. Null mice Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR KO) were bred on a C57BL/6 genetic background under pathogen-free conditions at the Instituto de Ciências Biológicas, (UFMG). All animal experiments were carried out in strict accordance with the recommendations in the Brazilian guidelines on animal work and recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (NIH). The animal ethics committee of the UFMG, CETEA/UFMG, approved all experiments and procedures including euthanasia, fluid and organ removal (Permit Number: 089/10).

**Parasites, infection and histopathology:** The Y strain of *T. cruzi* was maintained *in vivo* in Swiss mice. WT and AhR KO were infected intraperitoneally (i.p.) with  $1 \times 10^3$  trypomastigotes and parasitemia was periodically measured, in 5 $\mu$ l of blood from a tail vein [51], until 15 days post infection (dpi). For *in vitro* infection, trypomastigotes were

grown in RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and purified from a monkey kidney epithelial cell line (LLC-MK2). At indicated time-points (10 and 15 dpi) mice were euthanized with a sterilized mixture with 10 mg/Kg xylazine and 150 mg/Kg Ketamine in PBS and heart were removed, immediately fixed in 4% buffered formalin and tissues fragments were embedded in paraffin. Tissue sections (4  $\mu$ m thick) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined under light microscopy. Sections were captured with a digital camera (DEI-470; Optronics, Goleta, CA) connected to a microscope (IX70; Olympus, Center Valley, PA) with a magnification of x40. Heart inflammation was scored by counting the total numbers of inflammatory cells in 30 microscope fields (x 40) in serial tissue sections as previously described [52].

**Quantification of NO in serum:** NO was quantified as nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) by Griess method [53]. Nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) were reduced to nitrites by enzymatic conversion by nitrate reductase [54] (Roche). The  $\text{NO}_2^-$  concentration (mM) was determined by reference to a sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) standard curve (1000 to 13.25  $\mu$ M) containing nitrate reductase (absorbance at 550 nm).

**Measurement of NO, ROS and ONOO- *ex vivo*:** Splenocytes of non-infected and *T. cruzi*-infected WT and AhR KO mice were isolated ( $10^6$  cells/well) and incubated for 30 min at 37°C, protected from light, with 10 mM of 4,5-Diaminofluorescein diacetate solution (DAF-2DA, Sigma) to estimate NO, or 50 mM of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA, Invitrogen) to estimate ROS, or 25 mM of Dihydrorhodamine 123 (DHR 123, Invitrogen) to estimate ONOO-, as described in [55] with small modifications. For all analyses, fluorescence was quantified in a fluorometer (Synergy 2, BIOTEK, USA) at excitation wavelength 488 nm and



measuring emission at 515 nm. Data are expressed as fold change of arbitrary units of fluorescence.

### **Macrophage culture and its microbicidal activity, parasite uptake and ROS**

**production:** WT and AhR KO macrophages were harvested from peritoneal cavities 3 days after injection of 2 ml of 3% sodium thioglycollate. The cells were washed and cultured ( $5 \times 10^5$  or  $10^6$  cells/well) in RPMI 1640 (Cultlab, Curitiba, SP, Brazil) supplemented with 5% fetal bovine serum, 50  $\mu\text{mol/L}$  2-mercaptoethanol, 2mmol/L L-glutamine, and penicillin/streptomycin (all from GIBCO, Grand Island, NY). The adherent cells were obtained by remove of the nonadherent cells after 2 to 4 hours of incubation of single-cell suspensions in tissue culture plates at 37° C in 5% CO<sub>2</sub>. After overnight incubation of the adherent cells at 37° C in 5% CO<sub>2</sub>, the supernatant was removed, and trypomastigote forms of *T. cruzi* were added at a 5:1 parasite-to-cell ratio, incubated for 3 hours, after which extracellular parasites were removed. The intracellular amastigote rate was evaluated in macrophages plated ( $5 \times 10^5$  cell/well) onto chamber slides (Nalge Nunc, Naperville, IL), at 4h (for uptake) and 48 h (for growth) post infection. Parasite growth was also evaluated by daily counting of released trypomastigotes in the supernatant of infected macrophages ( $5 \times 10^5$  cell/well) on days 4 to 7 post infection as described [51]. For ROS detection we performed a real time chemiluminescence assay as described in [56] wherein WT and AhR deficient macrophages ( $10^6$  cells/well) were isolated and cultured ( $10^6$  cells/well) overnight, in opaque 96-well plates, as described above. After overnight culture, 0.05 mM of luminol (5-Amino-2,3-dihydro- 1,4-phthalazinedione) (Sigma-Aldrich Co.), zymosan A (10:1 particles/cell ratio), apocynin (300 $\mu\text{M}$ ) ( all from Sigma-Aldrich Co.) and parasites were added to culture. Light emission was quantified every two minutes during three

hours in a luminometer (Packard, Waltham, MA, EUA). Data was represented as relative light units (RLU).

**Flow cytometry:** Splenic cells were evaluated *ex vivo* for the expression of extracellular molecules and for intracellular cytokine synthesis. Spleens were removed from infected mice at 10 and 15 dpi and splenocytes suspensions prepared as described in [23]. Each sample comprised a pool of three mice spleens that were incubated with Brefeldin A (1 $\mu$ g/ml) for 4 hours followed by fixation and staining with specific antibodies combination: CD8 (PERCP), CD4 (PE), IFN- $\gamma$  (Alexa 488), CD11c (FITC), IL-12 (PE), F4/80 (Alexa 488) and isotype controls (all from BD Pharmingen). Data were acquired on a FACScan (Becton Dickinson) and viable cells were analyzed by flow cytometry using FACS DIVA software (BD Pharmingen).

**Total RNA extraction, cDNA production and polymerase chain reaction (PCR):** *T. cruzi*-infected WT and AhR KO splenic and cardiac tissues were removed at 10 and 15 dpi and total RNA was isolated using 1ml of Brazol reagent (LGC Biotecnologia) according to manufacturer's instructions, followed by the addition of 0.2 ml of chloroform (Sigma Chemical Co.). 2  $\mu$ g of purified RNA was used to synthesize cDNA using Superscript IITM (GIBCO). The expression of mRNA for cytokines (IL-12 and IFN- $\gamma$ ) and  $\beta$ -actin was analyzed by RT-PCR, with GoTagGreen Master Mix (Promega) in a PTC-100 thermal cycler (MJ Research). The reaction conditions were 34 cycles of 1 min at 94 $^{\circ}$  C, 1 min at 60 $^{\circ}$  C and 1 min at 72 $^{\circ}$  C, with a final extension step of 2 min at 72 $^{\circ}$  C. PCR products (semi-quantitative PCR) were separated by agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed on an ABI PRISM Step-One sequence-detection system (Applied

Biosystems, Carlsbad, CA) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) for the genes IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17A, Foxp3, IL-10, SOCS1, SOCS2 and SOCS3. GAPDH or 18S gene was used as endogenous control for normalization. The relative expression level of genes was determined by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method [57, 58] and data were normalized by GAPDH or 18S expression. The sequences of primers used in this study were as follows: 18S Forward CTC AAC ACG GGA AAC CTC AC; Reverse CGT TCC ACC AAC TAA GAA CG, AhR Forward CAG TGG GAA TAA GGC AAG AGT GA; Reverse AGG GAG ATG AAG TAT GTG TAT GTA, Foxp3 Forward CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT; Reverse TTC TCA CAA CCA GGC CAC TTG, GAPDH Forward ACG GCC GCA TCT TCT TGT GCA; Reverse CGG CCA AAT CCG TTC ACA CCG A, IL-6 Forward TTC CAT CCA GTT GCC TTC TTG; Reverse TTG GGA GTG GTA TCC TCT GTG A, IL-10 Forward GCT CTT ACT GAC TGG CAT GAG; Reverse CGC AGC TCT AGG AGC ATG TG, IL-17A Forward TCC AGA AGG CCC TCA GAC TA; Reverse TGA GCT TCC CAG ATC ACA GA, SOCS1 Forward GCA TCC CTC TTA ACC CGG TAC; Reverse AAT AAG GCG CCC CCA CTT A, SOCS2 Forward CGC GTC TGG CGA AAG C; Reverse TTC TGG AGC CTC TTT TAA TTT CTC TT and SOCS3 Forward TTT GCG CTT TGA TTT GGT TTG; Reverse TGG TTA TTT CTT TGG CCA GCA, TNF- $\alpha$  Forward ACG GCA TGG ATC TCA AAG AC; Reverse AGA TAG CAA ATC GGC TGA CG.

**Statistical analysis:** Results are shown as means +/- standard error of the mean (SEM). Differences were compared by using Student's t test, analysis of variance (ANOVA) or Two-way ANOVA followed by Bonferroni corrections as needed for multiple comparisons (Graph Prism Software 4.0). Results with a  $P < 0.05$  were considered significant.

## RESULTS

### Modulation of AhR expression during *T. cruzi* infection.

To investigate the involvement of AhR during *T. cruzi* infection we have first analyzed the AhR gene expression in relevant organs of infected WT mice by RT-PCR. We found that AhR mRNA was upregulated in spleen after infection at all time points investigated, being the strongest expression at 75 dpi (**Figure 1A**). Similarly, AhR expression in heart was upregulated at all time points investigated (**Figure 1B**). Next, we investigated the role of AhR in the parasitemia levels during the acute phase of *T. cruzi* infection. We found that AhR KO mice presented an important reduction in parasitemia at 9 dpi when compared with WT counterparts (**Figure 1C**). These results support the idea that AhR plays a role during *T. cruzi* infection.

### Increased levels of ROS, but not of NO and ONOO<sup>-</sup>, in spleen of *T. cruzi*-infected AhR KO mice.

As ROS, ONOO<sup>-</sup> and NO are important cytotoxic mediators during *T. cruzi* infection, we decided to analyze the levels of these molecules in *T. cruzi*-infected WT and AhR KO mice. We measured systemic NO levels in the serum of *T. cruzi*-infected WT and AhR KO mice and found that NO concentration was just significantly increased at 15 dpi in AhR KO mice when compared with WT (**Figure 1D**). Notably, this augmented amount of NO in AhR KO mice corresponded to a time point subsequent to the parasitemia control observed on this group of mice (**Figure 1C**). In the spleen, AhR deficiency resulted in an increased production of ROS (**Figure 1E**), but not of ONOO<sup>-</sup> and NO, (**Figures 1F and 1G**) at 10 dpi when compared with WT. Together, these data suggested that NO is not involved in the increased ability of parasite clearance observed

in AhR KO mice, and indicated that, *in vivo*, ROS might be one, among others mediators, responsible for direct parasite clearance in the absence of AhR.

**Deficiency of AhR results in reduction of ROS production and decreases *T. cruzi* burden in macrophages.**

The understanding of macrophages responses is important to elucidate the balance between the mechanism by which the host is able to combat the parasite proliferation and the ability of the parasite to evade the host immune response. When macrophages obtained from AhR KO mice were *in vitro* infected with *T. cruzi*, an increased microbicidal activity was observed. The amount of released trypomastigotes as well as the intracellular amastigotes was significantly decreased in these cells when compared with WT counterparts (**Figures 2A** and **2B**, respectively). This was not associated with a defect in the entry of parasites since uptake assays showed no difference in the number of amastigotes between WT and AhR KO cells (**Figure 2C**). Next, we investigated the ability of AhR deficient macrophages to produce ROS. We observed that unstimulated AhR-deficient macrophages, *in vitro*, produced similar levels of ROS than WT cells (**Figure 2D**). However, the deficiency of AhR resulted in dramatically decreased in the production of ROS by macrophages stimulated with Zymosan (**Figure 2E**) and infected with *T. cruzi* (**Figure 2F**). Addition of apocynin, a drug that inhibit ROS production, resulted in decreased ROS production by WT and AhR KO cells, indicating that the ROS production by macrophages is partially dependent of AhR. All together these results suggests that AhR controls the levels of ROS production by *T. cruzi*-infected macrophages, which are necessary for the parasite replication. Indeed, ROS was demonstrated to have a nutritional, and not cytotoxic, role for *T. cruzi in vitro* [48]

**Deficiency of AhR causes a strong pro-inflammatory response in the spleen of *T. cruzi* infected mice.**

IL-12 and IFN- $\gamma$  are important cytokines released during innate and acquired immune response to control *T. cruzi* infection. We analyzed the production of these cytokines in the spleen at 10 dpi. We found an increased production of IL-12 by CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and F480<sup>+</sup> cells (**Figures 3A and 3B, respectively**) and of IFN- $\gamma$  by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells (**Figures 3C and 3D, respectively**) in *T. cruzi*-infected AhR KO mice when compared to WT counterparts. Additionally, we evaluated mRNA levels of other relevant cytokines like IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17 and IL-10, as well as, the transcription factor Foxp3 and SOCS1/ SOCS2/SOCS3 at 10 and 15 dpi. We observed no difference in IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA levels (**Figures 4A and 4B**). By contrast, IL-17 levels (**Figure 4C**) were increased in the spleen of AhR KO at 10 dpi. FoxP3 mRNA expression (**Figure 4D**), marker of regulatory T-cells (Treg), was significantly higher at 15 dpi, while IL-10 levels (**Figure 4E**) was reduced in the spleen of AhR KO at the same time point. Our analysis also showed that the mRNA of SOCS1, SOCS2 and SOCS3 was increased in infected AhR deficient mice when compared with WT counterparts (**Figures 4F, 4G and 4H**).

***T. cruzi*- induced heart inflammation is reduced in the absence of AhR.**

We observed that *T. cruzi* infection induced a poor inflammatory infiltrate in WT and AhR KO mice at 10 dpi (**Figures 5B, 5E and 5G**). Importantly, the quantity of inflammatory cells increased at 15 days upon infection, being this infiltrate significantly lower in the heart of AhR KO mice (**Figures 5C, 5F and 5G**). To characterize further the inflammatory profile in the heart of infected AhR KO and WT mice, we have

analyzed the mRNA levels of pro-inflammatory cytokines IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17; the anti-inflammatory cytokine IL10 and the cytokine signal regulators SOCS1, 2, 3. Our results shows that mRNA of pro-inflammatory cytokines IL-12 (**Figure 6A**), IL-6 (**Figure 6B**) and TNF- $\alpha$  (**Figure 6C**) were increased in the heart of infected AhR KO mice at 15 dpi Interestingly, the amount of IFN- $\gamma$  was notably lower in AhR KO when compared with WT mice (**Figure 6D**). We did not find differences in IL-17, Foxp3 and IL-10 mRNA levels (**Figures 6E-G**). With regards the expression of SOCS mRNA in the heart of AhR KO mice, we have found that SOCS2 and SOCS3, but not SOCS1 (**Figures 6H-J**), were significantly reduced at 10 dpi when compared to WT.

## DISCUSSION

It has been described that AhR is crucial for a range of functions of the immune system in the context of autoimmunity and infection [5, 59]. However, so far, is still unknown how AhR regulates the immune response during *T. cruzi* infection. First, we demonstrated that AhR is upregulated in spleen and heart of *T. cruzi*-infected WT mice suggesting that this transcription factor might have important functions during this infection. Another evidence of its relevance is the dramatic reduction in parasitemia found in AhR KO mice when compared with WT. One might wonder if this effect could be explained by the ability of AhR KO cells to produce high amounts of systemic NO, an important cellular signaling molecule involved in parasite clearance [51]. Nevertheless, our results demonstrated that NO is not related with it since we did not find difference in NO levels, in serum and spleen, at time points of infection at which parasitemia was efficiently controlled. Despite that NO levels could not explain the reduction in peripheral parasitemia in deficient mice, the increased ROS levels, but not peroxynitrite, might indicate that this compound could contribute, together with cytokines, with the greatest resolution of the initial infection observed in AhR deficient mice. Although ROS was elevated in spleen during *T. cruzi* infection, our *in vitro* infection demonstrated that ROS production by macrophages was importantly compromised due to the absence of AhR. This was expected since has been previously reported that AhR contributes substantially to ROS production [4, 47, 48]. Our finding that *T. cruzi* had an impairment to replicate inside AhR KO macrophages could be explained by the existing evidence on the importance of ROS as a factor that support intracellular *T. cruzi* growth [48], therefore, explaining the defect in parasites replication observed by us in AhR KO macrophages. Thus, ROS could have ambiguous roles that



are likely dependent on its concentration [47] and location (tissue/cells) of production. Furthermore, our results showed that activation of macrophages with Zymosan, a component commonly used to model proinflammatory activation of macrophages, induced ROS in an AhR-partially-dependent manner, demonstrating that this receptor is important to modulate ROS production by macrophages upon different stimulus. .

Absence of AhR was also related to an increased production of IL-12 by dendritic cells and macrophages, of IFN- $\gamma$  by CD4 and CD8 T cells, and IL-17 by splenocytes at 10 dpi, resulting in a precocious inflammatory immune response when compared with WT. The reduced expression of IL-17 observed in AhR KO mice at 15 dpi could be related with the increase expression of Foxp3, but not of IL-10, at this time point, reflecting an increase in Treg cells population. Treg cells are described to regulate cells function by secreting cytokines as IL-10 and TGF- $\beta$ , or by direct contact with surface receptors expressed by target cells (ref). This data corroborates that activation of AhR leads to a suppression of inflammation. During experimental colitis this suppression occurs by regulation of Foxp3 and IL-17 gene. In experimental cerebral malaria AhR KO mice also display an increased IL-17 levels in the brain that is associated with a reduction in expression of SOCS1 and SOCS3 [23, 60]. Herein, SOCS1 and SOCS3 were up regulated at 15 dpi, which could be associated with a reduction of IL-17 expression, as has been previously reported [61]

As heart is the major organ affected by *T. cruzi*, which altered function results in pathology, we evaluated the role of AhR on the generation/characteristic of the inflammatory infiltrate in *T. cruzi*-infected mice. No difference in the amount of inflammatory cells was found at 10 dpi, but at 15 dpi, AhR deficient mice displayed a reduced number of inflammatory cells in the myocardium when compared with WT.

Nevertheless, the mRNA expression of several pro inflammatory cytokines (IL-12, IL-6 and TNF- $\alpha$ ) was significantly enhanced in the heart of AhR KO infected mice, associated with decreased expression of SOCS2 and SOCS3. From these findings, we could infer that despite AhR KO have reduced number of inflammatory cells, those that were locally resident and/or recruited, were more responsive than WT cells. On the other hand, the reduced mRNA levels of IFN- $\gamma$  observed in AhR KO mice at both time points might probably be correlated with reduced migration of T cells to the myocardium and/or decreased capacity of these cells to produce IFN- $\gamma$  in the absence of the AhR receptor. The decrease expression of IFN- $\gamma$  could also explains the reduced expression of SOCS3 mRNA found in the myocardium of *T.cruzi*-infected AhR KO mice.

Previously, we demonstrated that AhR participate in lipoxins induction of SOCS2 in dendritic cells [22], and that deficiency of SOCS2 results in heart dysfunction during experimental *T. cruzi* infection [62]. Here, our results demonstrated that AhR-deficient mice had a significant reduction of SOCS2 expression in the heart during *T. cruzi* infection, supporting our previous findings. In summary, this study demonstrates the importance of AhR in experimental *T. cruzi* infection, highlighting that absence of AhR results in higher resistance, an anticipate immune response, lower heart inflammation *in vivo* at the cost of reduction of SOCS2 expression in the heart, which was previously proven to be crucial for myocardium protection/function during *T. cruzi* infection [22, 62]. The modulation of ROS synthesis by AhR, and the differences observed in the function of ROS *in vivo* and *in vitro*, demonstrates that, during *T. cruzi* infection, this compound has a role in a concentration and local manner. Other authors have already reported conflicting functions of AhR in ROS production [13]. Together, our work provides the first clue about the role of AhR in the modulation of ROS

production during the experimental *T. cruzi* infection, and also suggested that AhR, originally associated with dioxin response, may be directly targeted for the modulation of immune response and development of pathology in Chagas` disease.

## REFERENCES

1. Poland AP, Glover E, Robinson JR, Nebert DW. Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase activity. Induction of monooxygenase activities and cytochrome P1-450 formation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice genetically "nonresponsive" to other aromatic hydrocarbons. *J Biol Chem* **1974**; 249:5599-606.
2. Poland A, Glover E, Kende AS. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem* **1976**; 251:4936-46.
3. Poland A, Glover E. Chlorinated biphenyl induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity: a study of the structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* **1977**; 13:924-38.
4. Denison MS, Soshilov AA, He G, DeGroot DE, Zhao B. Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol Sci* **2011**; 124:1-22.
5. Quintana FJ, Sherr DH. Aryl hydrocarbon receptor control of adaptive immunity. *Pharmacol Rev* **2013**; 65:1148-61.
6. DiNatale BC, Murray IA, Schroeder JC, et al. Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicol Sci* **2010**; 115:89-97.
7. Schaldach CM, Riby J, Bjeldanes LF. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry* **1999**; 38:7594-600.
8. Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol* **2010**; 185:3190-8.
9. Seidel SD, Winters GM, Rogers WJ, et al. Activation of the Ah receptor signaling pathway by prostaglandins. *J Biochem Mol Toxicol* **2001**; 15:187-96.

10. Flaveny CA, Perdew GH. Transgenic Humanized AHR Mouse Reveals Differences between Human and Mouse AHR Ligand Selectivity. *Mol Cell Pharmacol* **2009**; 1:119-23.
11. Schroeder JC, Dinatale BC, Murray IA, et al. The uremic toxin 3-indoxyl sulfate is a potent endogenous agonist for the human aryl hydrocarbon receptor. *Biochemistry* **2010**; 49:393-400.
12. Perdew GH. Chemical cross-linking of the cytosolic and nuclear forms of the Ah receptor in hepatoma cell line 1c1c7. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**; 182:55-62.
13. Kimura A, Abe H, Tsuruta S, et al. Aryl hydrocarbon receptor protects against bacterial infection by promoting macrophage survival and reactive oxygen species production. *Int Immunol* **2014**; 26:209-20.
14. Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**; 93:6731-6.
15. Temchura VV, Frericks M, Nacken W, Esser C. Role of the aryl hydrocarbon receptor in thymocyte emigration in vivo. *Eur J Immunol* **2005**; 35:2738-47.
16. Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, et al. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* **1995**; 268:722-6.
17. Shi LZ, Faith NG, Nakayama Y, Suresh M, Steinberg H, Czuprynski CJ. The aryl hydrocarbon receptor is required for optimal resistance to *Listeria monocytogenes* infection in mice. *J Immunol* **2007**; 179:6952-62.
18. Zhou L, Littman DR. Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. *Curr Opin Immunol* **2009**; 21:146-52.
19. Neff-LaFord H, Teske S, Bushnell TP, Lawrence BP. Aryl hydrocarbon receptor activation during influenza virus infection unveils a novel pathway of IFN-gamma production by phagocytic cells. *J Immunol* **2007**; 179:247-55.

20. Wheeler JL, Martin KC, Lawrence BP. Novel cellular targets of AhR underlie alterations in neutrophilic inflammation and inducible nitric oxide synthase expression during influenza virus infection. *J Immunol* **2013**; 190:659-68.
21. Elizondo G, Rodríguez-Sosa M, Estrada-Muñiz E, Gonzalez FJ, Vega L. Deletion of the aryl hydrocarbon receptor enhances the inflammatory response to *Leishmania major* infection. *Int J Biol Sci* **2011**; 7:1220-9.
22. Machado FS, Johndrow JE, Esper L, et al. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. *Nat Med* **2006**; 12:330-4.
23. Brant F, Miranda AS, Esper L, et al. Immune response profile and development of pathology during *Plasmodium berghei* Anka infection: the role of the aryl hydrocarbon receptor (AhR). *Infect Immun* **2014**.
24. Delgado-Ortega M, Marc D, Dupont J, Trapp S, Berri M, Meurens F. SOCS proteins in infectious diseases of mammals. *Vet Immunol Immunopathol* **2013**; 151:1-19.
25. Ribeiro AL, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MO. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* **2012**; 9:576-89.
26. Machado FS, Dutra WO, Esper L, et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol* **2012**; 34:753-70.
27. Machado FS, Tanowitz HB, Ribeiro AL. Pathogenesis of chagas cardiomyopathy: role of inflammation and oxidative stress. *J Am Heart Assoc* **2013**; 2:e000539.
28. Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* **1996**; 64:1961-7.
29. Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* **1992**; 175:169-74.

30. Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun* **1995**; 63:4862-7.
31. Torrico F, Heremans H, Rivera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* **1991**; 146:3626-32.
32. Silva JS, Machado FS, Martins GA. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front Biosci* **2003**; 8:s314-25.
33. Alvarez MN, Peluffo G, Piacenza L, Radi R. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J Biol Chem* **2011**; 286:6627-40.
34. Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem J* **2008**; 410:359-68.
35. Ba X, Gupta S, Davidson M, Garg NJ. *Trypanosoma cruzi* induces the reactive oxygen species-PARP-1-RelA pathway for up-regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **2010**; 285:11596-606.
36. Gupta S, Bhatia V, Wen JJ, Wu Y, Huang MH, Garg NJ. *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med* **2009**; 47:1414-21.
37. Dhiman M, Garg NJ. NADPH oxidase inhibition ameliorates *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis during Chagas disease. *J Pathol* **2011**; 225:583-96.
38. Santiago HC, Gonzalez Lombana CZ, Macedo JP, et al. NADPH phagocyte oxidase knockout mice control *Trypanosoma cruzi* proliferation, but develop circulatory collapse and succumb to infection. *PLoS Negl Trop Dis* **2012**; 6:e1492.

39. Wild AC, Gipp JJ, Mulcahy T. Overlapping antioxidant response element and PMA response element sequences mediate basal and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit gene. *Biochem J* **1998**; 332 ( Pt 2):373-81.
40. Moinova HR, Mulcahy RT. Up-regulation of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene involves binding of Nrf-2 to an electrophile responsive element. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**; 261:661-8.
41. Kim YC, Yamaguchi Y, Kondo N, Masutani H, Yodoi J. Thioredoxin-dependent redox regulation of the antioxidant responsive element (ARE) in electrophile response. *Oncogene* **2003**; 22:1860-5.
42. Inamdar NM, Ahn YI, Alam J. The heme-responsive element of the mouse heme oxygenase-1 gene is an extended AP-1 binding site that resembles the recognition sequences for MAF and NF-E2 transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* **1996**; 221:570-6.
43. Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* **2003**; 278:8135-45.
44. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* **1991**; 10:2247-58.
45. Schmidt KN, Traenckner EB, Meier B, Baeuerle PA. Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF-kappa B. *J Biol Chem* **1995**; 270:27136-42.
46. Halliwell B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem Sci* **2006**; 31:509-15.



47. Menna-Barreto RF, de Castro SL. The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. *Biomed Res Int* **2014**; 2014:614014.
48. Paiva CN, Feijó DF, Dutra FF, et al. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Clin Invest* **2012**; 122:2531-42.
49. Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun* **1996**; 64:128-34.
50. Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* **1994**; 153:3135-40.
51. Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation* **2000**; 102:3003-8.
52. Pavanelli WR, Gutierrez FR, Mariano FS, et al. 5-lipoxygenase is a key determinant of acute myocardial inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect* **2010**; 12:587-97.
53. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* **1982**; 126:131-8.
54. Gilliam MB, Sherman MP, Griscavage JM, Ignarro LJ. A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by *Aspergillus* nitrate reductase. *Anal Biochem* **1993**; 212:359-65.
55. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* **1994**; 16:149-56.
56. Faulkner K, Fridovich I. Luminol and lucigenin as detectors for O<sub>2</sub><sup>-</sup>. *Free Radic Biol Med* **1993**; 15:447-51.
57. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C(T)$ ) Method. *Methods* **2001**; 25:402-8.

58. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* **2008**; 3:1101-8.
59. Quintana FJ. The aryl hydrocarbon receptor: a molecular pathway for the environmental control of the immune response. *Immunology* **2013**; 138:183-9.
60. Singh NP, Singh UP, Singh B, Price RL, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) leads to reciprocal epigenetic regulation of FoxP3 and IL-17 expression and amelioration of experimental colitis. *PLoS One* **2011**; 6:e23522.
61. Wormald S, Zhang JG, Krebs DL, et al. The comparative roles of suppressor of cytokine signaling-1 and -3 in the inhibition and desensitization of cytokine signaling. *J Biol Chem* **2006**; 281:11135-43.
62. Esper L, Roman-Campos D, Lara A, et al. Role of SOCS2 in modulating heart damage and function in a murine model of acute Chagas disease. *Am J Pathol* **2012**; 181:130-40.

## LEGENDS

**Figure 1. *T. cruzi* infection modulates AhR expression that is associated with regulation of ROS production.** WT mice were infected intraperitoneally with  $10^3$  trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). **(A)** Spleens and **(B)** hearts were harvested and AhR mRNA was assessed by RT-PCR at 9, 15, 30, 45 and 75 dpi For analysis, data was normalized to  $\beta$ -actin expression and to non-infected control *T. cruzi*-infected WT. **(C)** Parasitemia was measured every 2 days from 3 to 15 dpi from tail vein blood samples. **(D)** NO levels were measured in the serum of *T. cruzi*-infected AhR KO and WT mice by Griess method with previous conversion of  $\text{NO}_3^-$  to  $\text{NO}_2^-$ , by nitrate reductase at 10 and 15 dpi. Spleen from *T. cruzi*-infected AhR KO and WT mice was processed for *ex vivo* measurement of **(E)** reactive oxygen species (ROS), **(F)** peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ), **(G)** and nitric oxide (NO) production by chemical fluorescent staining at 10 dpi. Data

was normalized to AhR KO and WT non-infected animals. (C) Data is shown as the mean  $\pm$  SD of the number of the parasites per ml of blood from one representative of 3 independent experiments. \*\*\* $P < 0,001$ , (D-F) \*\*\* $P < 0,006$ . (G) \* $P < 0,05$ .

**Figure 2. Reduction of ROS production by *T. cruzi*-infected AhR KO macrophages decreased parasite replication.** WT and AhR KO peritoneal macrophages were cultured and infected with trypomastigotes form of *T. cruzi* (5:1) and ROS production were measured as described in material and methods. (A) The released trypomastigotes were counted daily from four to seven dpi *T. cruzi*-infected WT and AhR KO macrophages were fixed and stained at (B) 48 h and (C) 4 h (Uptake) post infection, and intracellular amastigotes were counted in 300 cells. ROS production by WT and AhR deficient macrophages cultured with (D) medium alone, (E) zymosan and/or apocynin, and (F) *T. cruzi* and/or apocynin were represented as relative light units. Each point represents means  $\pm$  SEM of three independent experiments in triplicate samples \*\*  $P < 0.01$

**Figure 3. A pronounced pro inflammatory response is induced in the spleen of *T. cruzi*-infected AhR KO mice.** WT and AhR KO mice were infected with  $10^3$  trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). Spleens were processed and analyzed by flow cytometry at 10 dpi Intracellular detection was done for (A) CD11c<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup>, (B) F480<sup>+</sup> IL-12<sup>+</sup>, (C) CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and (D) CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells. The results are presented as mean-fold change compared to infected WT versus infected AhR KO mice. Data are shown as the means  $\pm$  SEM from one experiment from a pool of three animals per group and is representative of two independent experiments.

**Figure 4. Cytokines and SOCS profile in the spleen of *T. cruzi*-infected AhR KO and -WT mice.** WT and AhR KO mice were infected with  $10^3$  trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). Spleens were processed for total RNA extraction. mRNA Levels of (A) IL-6, (B) TNF- $\alpha$ , (C) IL-17A, (D) Foxp3, (E) IL-10, (F) SOCS1, (G) SOCS2 and (H) SOCS3 were quantified at 10 and 15 dpi by qRT-PCR, analyzed by  $\Delta\Delta C_t$  method and represented as  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  \*\*\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,01$ , \* $P < 0,05$ . Data are presented as the means +/- SEM and is a representative of two independent experiments.

**Figure 5. Absence of AhR results in decreased inflammatory cells in heart of *T. cruzi* infected mice.** Representative H&E-stained sections of the heart from uninfected (A) WT and (D) AhR deficient mice, and *T. cruzi* infected (B-C) WT and (E-F) AhR deficient mice. (A, D) Represent normal histological appearance in uninfected animals at 10 dpi (B, E) Shows a discrete and multifocal infiltration of immune cells in myocardium from both infected groups (arrows) at 15 dpi (C) Multifocal to coalescing and intense inflammatory infiltration in the myocardium (arrows). (F) Multifocal and moderate myocarditis (arrows). Original magnification: A-F: x400. (G) Heart inflammation was scored at 10 and 15 dpi by counting the total numbers of inflammatory cells in 30 microscope fields (x 400) of each of five animals (per group) in serial tissue sections. Data are shown as the means +/- SEM from one experiment. \* $P < 0,05$

**Figure 6. Cytokines profile in the heart of *T. cruzi*-infected AhR KO and WT mice.** WT and AhR KO mice were infected with  $10^3$  trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). Heart were processed for total RNA extraction. mRNA levels of (A) IL-12, (B) IL-6,

(C) TNF- $\alpha$ , (D) IFN- $\gamma$ , and (E) IL-17A, (F) Foxp3, (G) IL-10, (H) SOCS1, (I) SOCS2 and (J) SOCS3 were measured at 10 and 15 dpi (A, D) were measured by RT-PCR and (B-C, E-J) by qPCR. For qPCR, analyzes were made by  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method and represented as  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . \*\*\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,01$ , \* $P < 0,05$ . Data are presented as the means +/- SEM and is of one representative of two independent experiments.

Figure 1

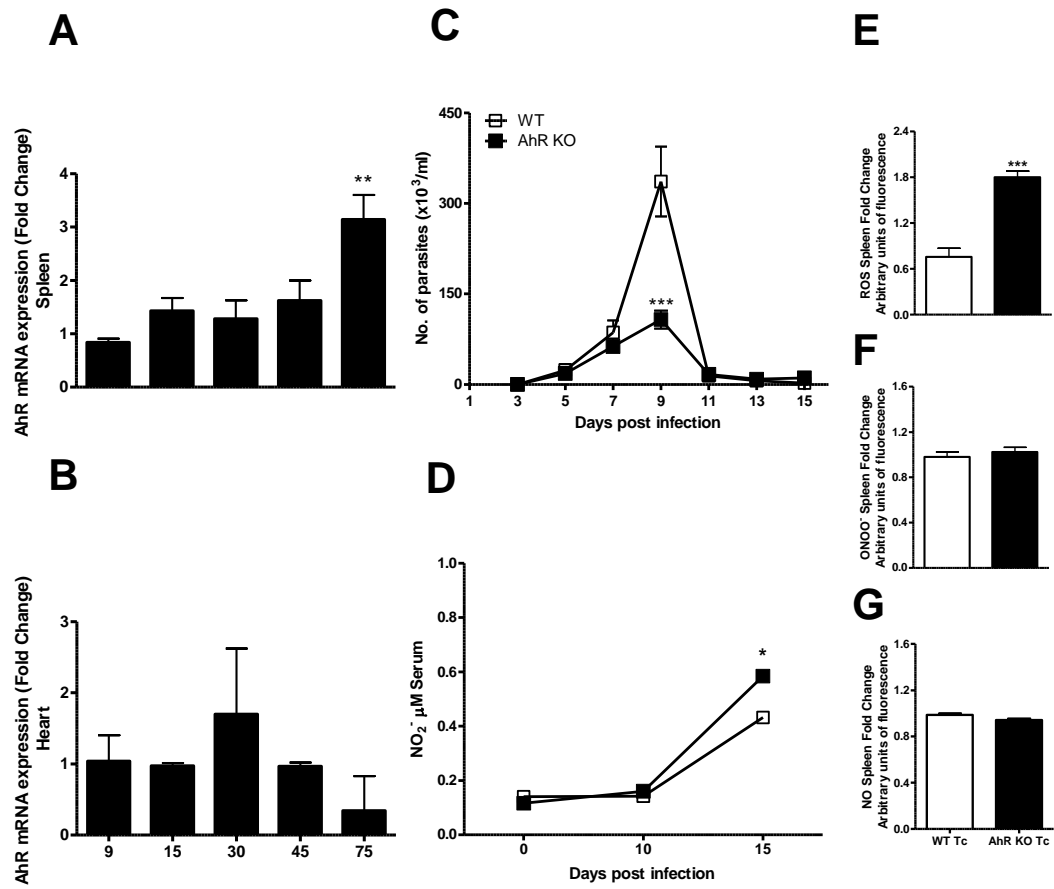


Figure 2

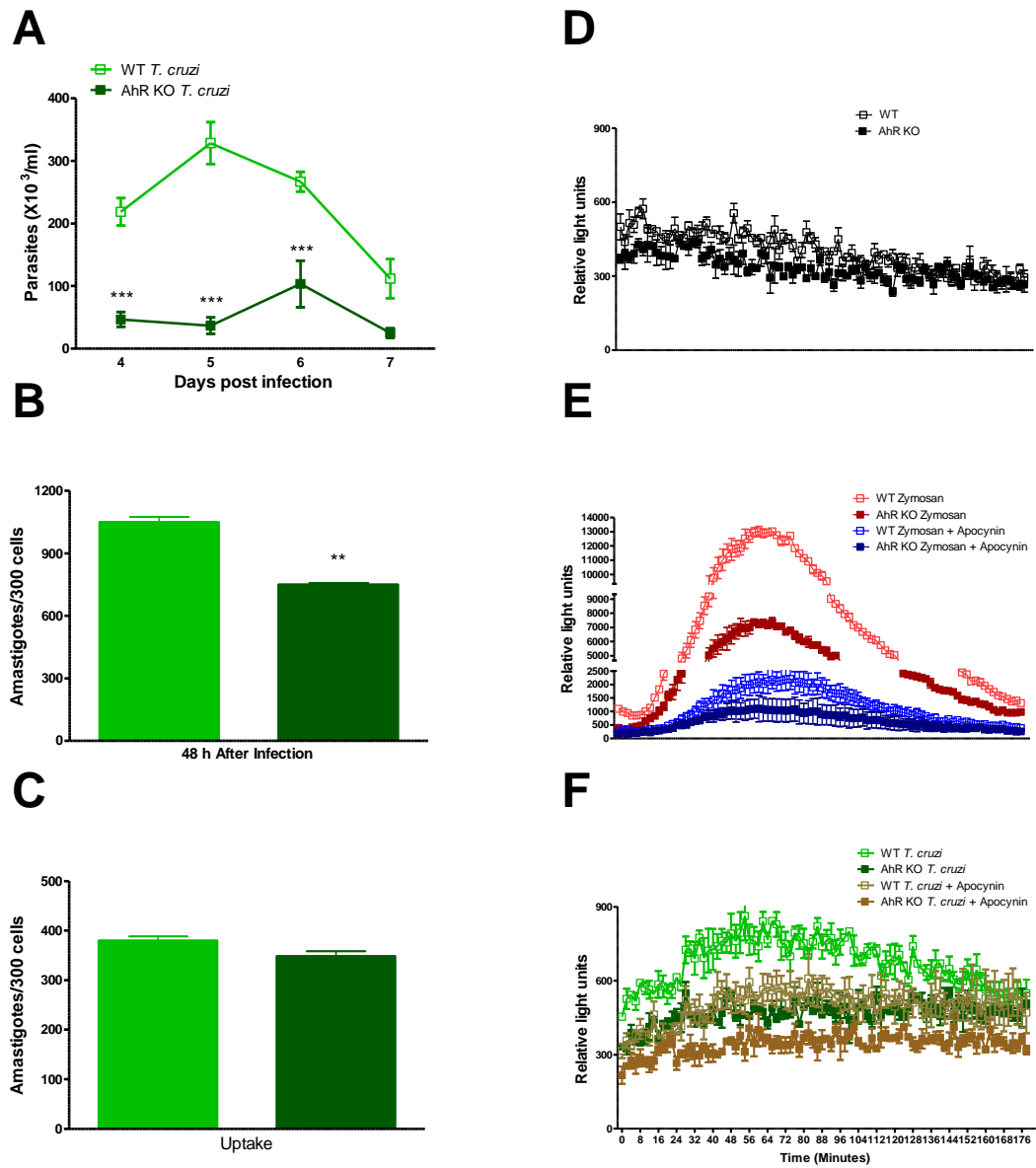


Figure 3

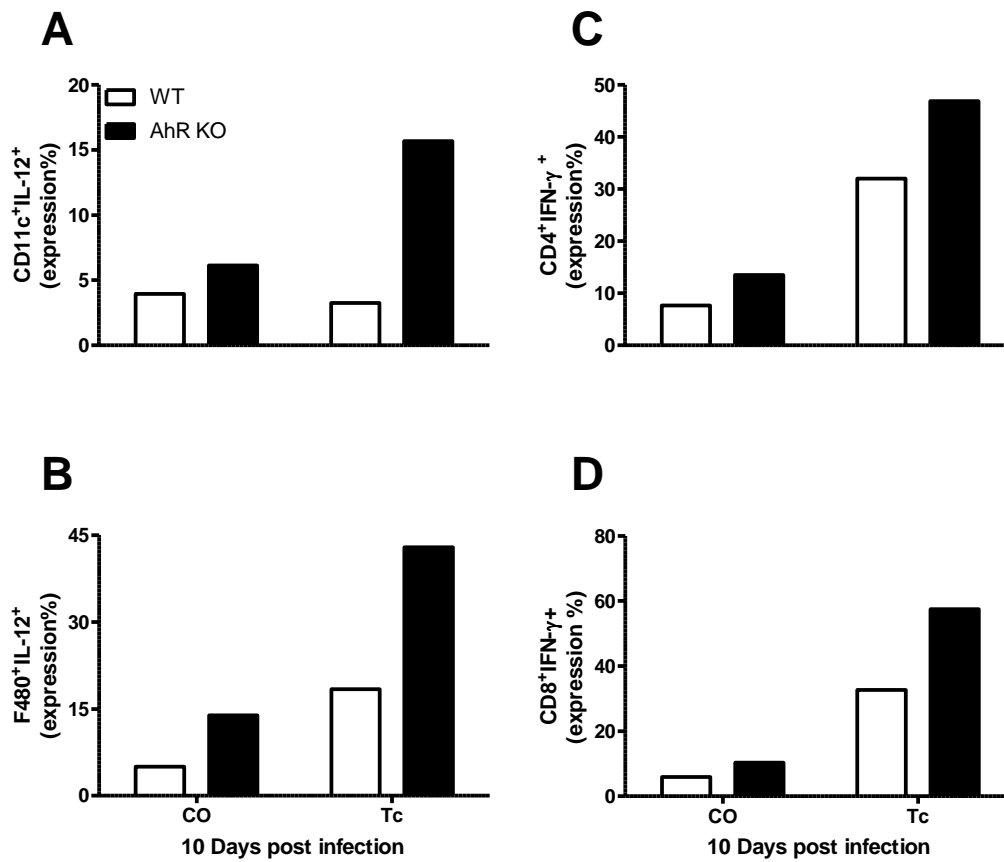




Figure 4

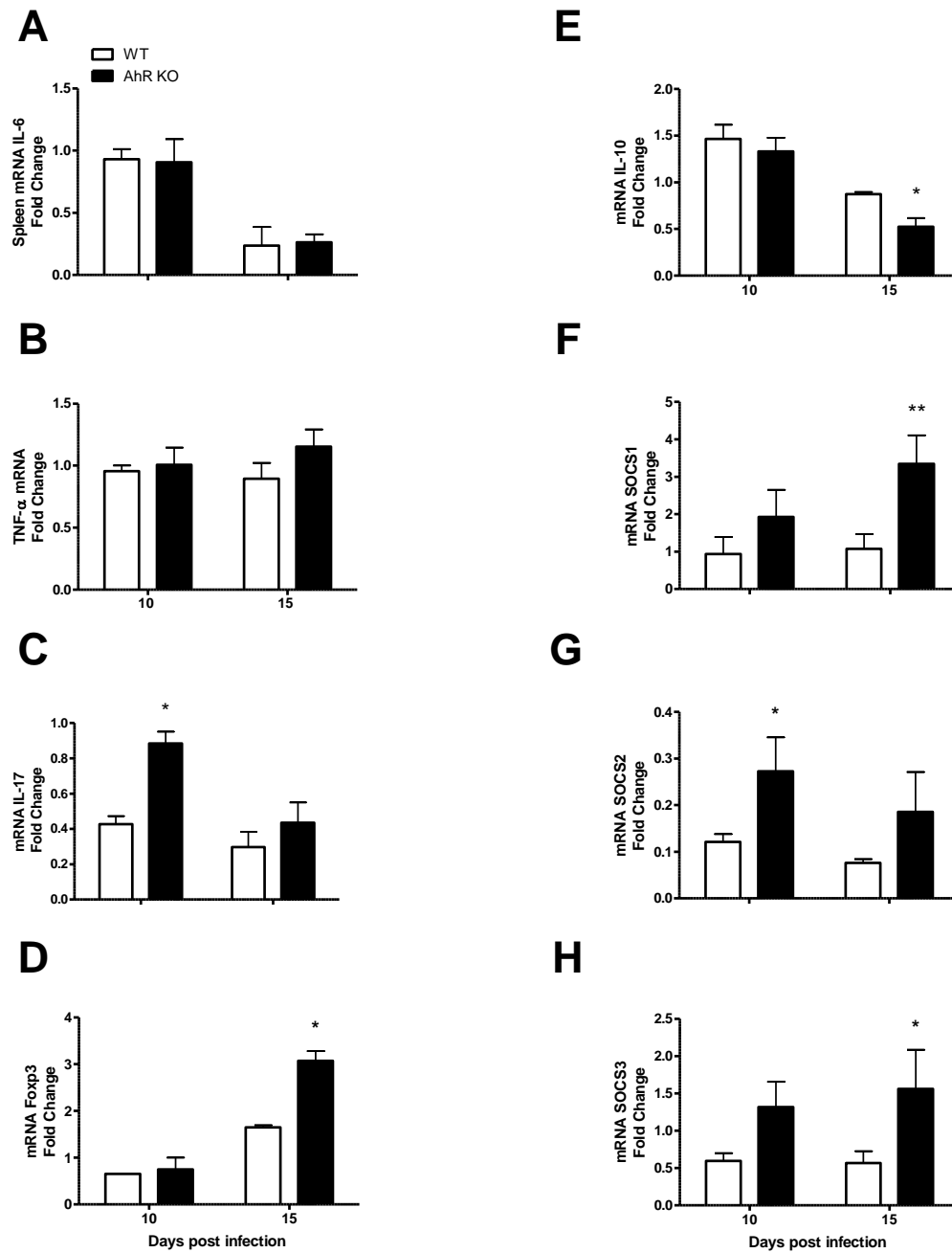


Figure 5

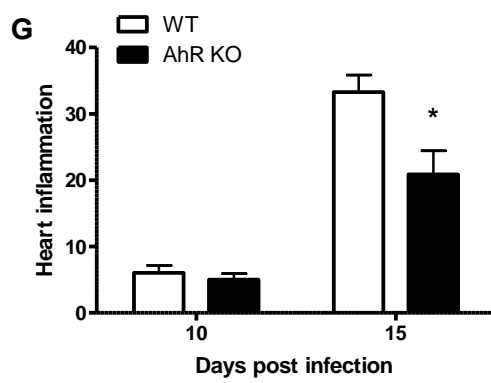
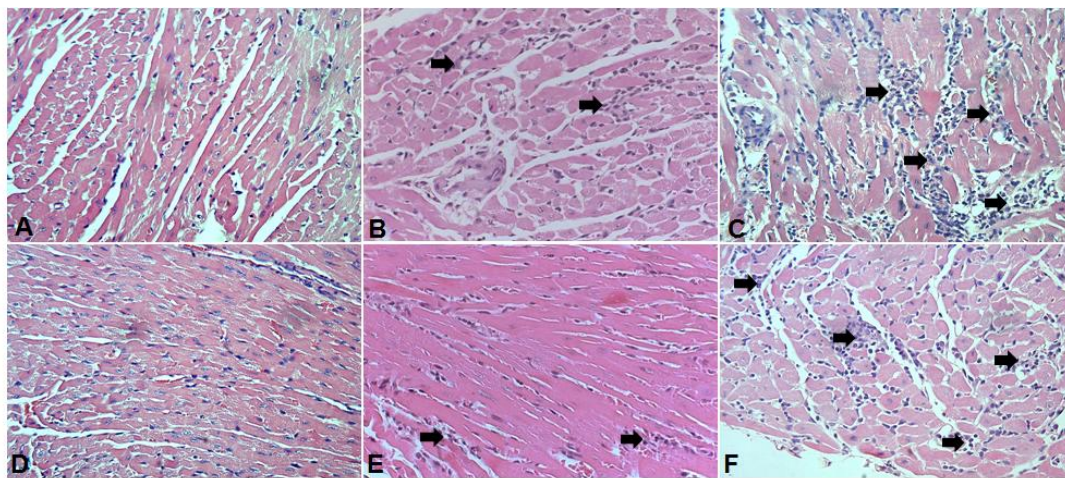


Figure 6

